

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503792

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	序内整理番号	F I	審査請求 有	予備審査請求 有	(全 34 頁)
G 0 1 N 33/49		E 7055-2 J				
C 1 2 M 1/34		D 7229-4 B				
G 0 1 N 15/14		A 6928-2 J				
		B 6928-2 J				
		C 6928-2 J				
(21) 出願番号	特願平5-514142		(71) 出願人	アボット・ラボラトリーズ		
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)2月3日			アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、		
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)8月8日			アボット・パーク、ワン・アボット・パー		
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 0 9 1 7			ク・ロード、チャド・0377/エイ・ビー・		
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 1 6 3 8 4			6・ディー2		
(87) 国際公開日	平成5年(1993)8月19日		(72) 発明者	ボン・ペーレンズ、ウィーランド・イー		
(31) 優先権主張番号	8 3 2, 4 7 1			アメリカ合衆国、カリフォルニア・		
(32) 優先日	1992年2月7日			94010-6752、ヒルズボロー、ヘイン・ロ		
(33) 優先権主張国	米国 (US)			ード・1360		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP		(72) 発明者	ヘイフリツチ、シエリー		
				アメリカ合衆国、カリフォルニア・94070、		
				サン・カルロス、マデラ・アベニュー・17		
			(74) 代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)		
				最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 細胞溶解処理条件下で異種細胞集団を正確に計数し、感受性に関する格付けを行う方法

(57) 【要約】

細胞を同定し、特徴付け、分類し、計数する方法。この方法は、応答を引き出すためにサンプルの条件を変えたときのサンプル中の種々細胞集団の生存に基づく。細胞は、無傷の細胞の消失を直接モニターするか、細胞構造、残骸、ゴーストまたは残余の出現によりモニターする。一態様では、溶血剤の存在下での白血球細胞崩壊速度を、いくつかの時間間隔で白血球数をモニターすることにより測定する。崩壊速度を使用すると、サンプル中の壊れやすい白血球の存在および白血球の数が測定できる。この方法は白血球計数の誤差を補正するものであり、溶解耐性赤血球の存在下で強い溶血剤の使用が可能である。白血球崩壊速度を時間0に外挿すると、サンプル中に元々存在する白血球数を正確に判定することができる。

(1 個の集団が完全に溶解する細胞サンプル)

1. 少なくとも 2 個の細胞集団を有するサンプル溶液中の第一細胞集団内に元々存在する単位体積当たりの細胞数を正確に判定する方法であって、該方法が、

- a) 第一細胞集団および第二細胞集団を有するサンプル溶液を提供する段階；
- b) 該サンプル溶液の物理化学的条件を調整して、該第二細胞集団内の細胞数を完全かつ迅速に溶解し、第一細胞集団内の細胞の連続した動的溶解を時間 0 で開始する段階；
- c) 時間 0 から時間間隔 A で、サンプル溶液の単位体積当たりの該第一細胞集団内における細胞数を計数する段階；
- d) 時間 0 から時間間隔 B で、サンプル溶液の単位体積当たりの該第一細胞集団内における細胞数を計数する段階；
- e) 段階 c) および d) からの細胞数ならびに時間間隔 A および B を使用して、第一細胞集団の細胞溶解速度を時間の関数として計算する段階；および
- f) 計算した第一細胞集団の細胞溶解速度関数を時間 0 に外挿

7. 細胞溶解速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

8. 少なくとも 2 個の細胞集団を有するサンプル溶液中の第一細胞集団内に元々存在する単位体積当たりの細胞数を、第二細胞集団の存在下で正確に判定する方法であって、該第一細胞集団が連続した動的細胞溶解速度を時間の関数として示し、サンプル溶液の物理化学的条件を該第二細胞集団の細胞溶解閾値を超えるように調整すると該第二細胞集団が迅速かつ完全な細胞溶解を受ける方法であって、該方法が、

- a) 第一細胞集団および第二細胞集団を有するサンプル溶液を提供する段階；
- b) サンプル溶液の単位体積当たりにおける該第一細胞集団内の細胞を同定・分類・計数する手段を提供する段階；
- c) サンプル溶液の物理化学的条件を、該第二細胞集団の細胞溶解閾値を超えるように調整して、該第二細胞集団の全細胞を時間 0 で完全かつ迅速に溶解させる段階；
- d) 段階 b) で提供される手段を使用して、時間 0 から時間間隔 A で、調整したサンプル溶液の第一部分体積中に存在する単位体積当たりの第一細胞集団細胞を同定・分類・計数する段階；

することによりサンプル溶液の単位体積当たりの該第一細胞集団内に元々存在する細胞数を判定する段階を含むことを特徴とする前記方法。

2. サンプル溶液が、生理学的液体、器官細胞懸濁物、植物細胞懸濁物、動物細胞懸濁物、培養中の細胞培養物およびそれらの混合物から成る群の構成員であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

3. 第一細胞集団が白血球であり、第二細胞集団が赤血球であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

4. 調整段階 b) が、サンプル溶液を溶解剤と接触させることを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

5. 細胞計数段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

6. 細胞計数段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

e) 段階 b) で提供される手段を使用して、時間 0 から時間間隔 B で、調整したサンプル溶液の第二部分体積中に存在する単位体積当たりの第一細胞集団細胞を同定・分類・計数する段階；

f) 段階 d) および e) で得た細胞計数データならびに時間間隔 A および B を使用して、第一細胞集団の細胞溶解速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 計算した第一細胞集団の細胞溶解速度関数を時間 0 に外挿することによりサンプル溶液の単位体積当たりの該第一細胞集団内に元々存在する細胞の数を判定する段階を含むことを特徴とする前記方法。

9. サンプル溶液が、生理学的液体、器官細胞懸濁物、植物細胞懸濁物、動物細胞懸濁物、培養中の細胞培養物およびそれらの混合物から成る群の構成員であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

10. 第一細胞集団が白血球であり、第二細胞集団が赤血球であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

11. 調整段階 c) が、サンプル溶液を溶解剤と接触させることを含むことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

12. 細胞の同定・分類・計数段階を、サンプル溶液が流れて

通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項8に記載の方法。

13. 細胞の同定・分類・計数段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを集集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項8に記載の方法。

14. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項8に記載の方法。

〔2個の集団が動的に溶解する細胞サンプル〕

15. サンプル溶液中の第一細胞集団内および第二細胞集団内に元々存在する、単位体積のサンプル溶液あたりの細胞数を正確に判定する方法であって、該第一細胞集団および第二細胞集団が、希釈サンプル溶液において、サンプル溶液の希釈により生じる物理化学的条件から得られる種々の崩壊速度で、連続的・動的に崩壊する方法において、該方法が、

a) 第一細胞集団および第二細胞集団を有するサンプル溶液を提供する段階；

b) 時間0で該サンプル溶液を希釈する段階であって、該希釈

15に記載の方法。

17. 第一細胞集団が白血球であり、第二細胞集団が赤血球であることを特徴とする請求項15に記載の方法。

18. 希釈段階b)が、サンプル溶液を溶解剤と接触させることを含むことを特徴とする請求項15に記載の方法。

19. 細胞計数段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項15に記載の方法。

20. 細胞計数段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを集集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項15に記載の方法。

21. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項15に記載の方法。

22. サンプル溶液がヒトの胎児または新生児患者から採取され、溶血耐性挙動を示すことを特徴とする請求項15に記載の方法。

23. 第一細胞集団内および第二細胞集団内に元々存在する、

段階により、第一および第二細胞集団両者の細胞が、サンプル溶液中の物理化学的条件の変化のために連続的・動的溶解を開始する段階；

c) 時間0から時間間隔Aで、希釈サンプル溶液の第一部分体積中に存在する、単位体積のサンプル溶液あたりの各集団の細胞数を計数する段階；

d) 時間0から時間間隔Bで、希釈サンプル溶液の第二部分体積中に存在する、単位体積のサンプル溶液あたりの各集団の細胞数を計数する段階；

e) 段階c)およびd)で得た細胞数および時間AおよびBを使用して、各細胞集団の細胞崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

f) 各細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することによりサンプル溶液の単位体積あたりの各細胞集団内に元々存在する細胞数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

16. サンプル溶液が、生理学的流体、器官細胞懸濁液、植物細胞懸濁液、動物細胞懸濁液、培養中の細胞培養物およびそれらの混合物から成る群の構成員であることを特徴とする請求項

単位体積のサンプル溶液あたりの細胞数を正確に判定する方法であって、該第一細胞集団および第二細胞集団が種々の連続した動的細胞溶解速度を時間の関数として示し、該サンプル溶液の物理化学的条件を該第二細胞集団内の細胞に対する細胞溶解閾値を超えるように調整すると、該第一細胞集団内および第二細胞集団内の細胞が細胞溶解を受けする方法において、該方法が、

a) 第一細胞集団および第二細胞集団を有するサンプル溶液を提供する段階；

b) サンプル溶液の単位体積あたりの該第一細胞集団内および第二細胞集団内の細胞を同定・分類・計数する手段を提供する段階；

c) サンプル溶液の物理化学的条件を、該第二細胞集団内の細胞に対する細胞溶解閾値を超えるように調整して、該第二細胞集団内の細胞の溶解を時間0で開始する段階；

d) 段階b)で提供された手段を使用して、時間間隔Aで、調整したサンプル溶液の第一部分体積中に存在する単位体積のサンプル溶液あたりの第一細胞集団細胞および単位体積のサンプル溶液あたりの第二細胞集団細胞を同定・分類・計数する段階；

e) 段階b)で提供された手段を使用して、時間間隔Bで、調

動したサンプル溶液の第二部分体積中に存在する単位体積のサンプル溶液あたりの第一細胞集団細胞および単位体積中のサンプル溶液あたりの第二細胞集団細胞を同定・分類・計数する段階；

(f) 段階d) およびe) で得た細胞計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、各細胞集団に対する細胞集団細胞の崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 各細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、サンプル溶液の単位体積あたりの各細胞集団内に元々存在する細胞数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

24. サンプル溶液が、生理学的液体、器官細胞懸濁物、植物細胞懸濁物、動物細胞懸濁物、培地中の細胞培養物およびそれらの混合物から成る群の構成員であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

25. 第一細胞集団が白血球であり、第二細胞集団が赤血球であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

26. 調整段階c) が、サンプル溶液を溶解剤と接触させることを含むことを特徴とする請求項23に記載の方法。

d) 段階c) で提供された手段を使用して、時間間隔Aでサンプル溶液の第一部分体積中に存在する、サンプル溶液の単位体積あたりの、溶解により生存する細胞を同定・分類・計数する段階；

e) 段階c) で提供された手段を使用して、時間間隔Bでサンプル溶液の第二部分体積中に存在する、サンプル溶液の単位体積あたりの、溶解により生存する細胞を同定・分類・計数する段階；

(f) 段階d) およびe) で得た細胞計数データならびに段階b) での溶血剤添加から各計数までの時間間隔を使用して、溶解により生存する細胞の崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 計算した細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、単位体積のサンプル溶液中に元々存在する溶解により生存する細胞の数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

31. 強い溶血剤が本質的に、i) 芳香族オキシエタノールと、ii) pKが8.5またはその付近であり、pH緩衝能を付与し且つ溶解剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と iii) 非

27. 細胞の同定・分類・計数段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項23に記載の方法。

28. 細胞の同定・分類・計数段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項23に記載の方法。

29. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項23に記載の方法。

(溶解耐性赤血球を含むサンプル)

30. 溶解耐性赤血球をも含むサンプル溶液中の細胞を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) 細胞、赤血球および溶解耐性赤血球を含むサンプル溶液を提供する段階；

b) サンプル溶液を強い溶血剤と時間0で接触させて、溶解耐性赤血球を含む全赤血球を完全かつ迅速に溶解する段階；

c) 単位体積のサンプル溶液中に存在する、溶解により生存する細胞を同定・分類・計数する手段を提供する段階；

イオン性洗剤化合物との水溶液からなることを特徴とする請求項30に記載の方法。

32. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物の水溶液から成ることを特徴とする請求項30に記載の方法。

33. サンプル溶液が、生理学的液体、器官細胞懸濁物、植物細胞懸濁物、動物細胞懸濁物、培地中の細胞培養物およびそれらの混合物から成る群の構成員であることを特徴とする請求項30に記載の方法。

34. 細胞の同定・分類・計数段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項30に記載の方法。

35. 細胞の同定・分類・計数段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項30に記載の方法。

36. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項30に記載の方法。

(溶解耐性赤血球を含むサンプル)

37. 溶解耐性赤血球をも含む全血サンプル中に存在する白血球を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) 赤血球、溶解耐性赤血球および白血球を含む全血サンプルを提供する段階；

b) 全血サンプルを強い溶血剤と時間0で接触させ、溶解耐性赤血球を含む全赤血球を完全かつ迅速に溶解してサンプル溶液を得る段階；

c) 白血球細胞を同定・分類・計数する手段を提供する段階；

d) 段階c) で提供された同定・分類・計数する手段を使用して、時間間隔Aでサンプル溶液の第一部分に存在する、サンプル溶液の単位体積あたりの、溶解により生存する白血球を同定・分類・計数する段階；

e) 段階c) で提供された同定・分類・計数する手段を使用して、時間間隔Bでサンプル溶液の第二部分に存在する、サンプル溶液の単位体積あたりの、溶解により生存する白血球を同定・分類・計数する段階；

f) 段階d) およびe) で得た細胞計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、白血球の崩壊速度を時間の関数とし

タを収集し、処置して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項37に記載の方法。

42. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項37に記載の方法。

(溶解耐性赤血球を含むサンプル)

43. 溶解耐性赤血球をも含む全血サンプル中に存在する白血球サブ集団を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) 白血球サブ集団を同定・分類・計数する手段を提供する段階；

b) 赤血球、溶解耐性赤血球および白血球を含む全血サンプルを提供する段階；

c) 全血サンプルを強い溶血剤と時間0で接触させ、溶解耐性赤血球を含む全赤血球を完全かつ迅速に溶解してサンプル溶液を得る段階；

d) 該サンプル溶液の第一部分体積を該同定・分類・計数手段に通して、時間間隔Aで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団内に存在する溶解により生存する細胞を計数する段階；

e) 該サンプル溶液の第二部分体積を該同定・分類・計数手段

で計算する段階；および

g) 白血球崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、単位体積のサンプル溶液中に元々存在する白血球の数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

38. 強い溶血剤が本質的に、i) 芳香族オキシエタノールと、ii) pKが8.5またはその付近であり、pH緩衝能を付与し且つ溶解剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と、iii) 非イオン性洗剤化合物との水溶液からなることを特徴とする請求項37に記載の方法。

39. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物の水溶液から成ることを特徴とする請求項37に記載の方法。

40. 細胞の同定・分類・計数段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処置して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項37に記載の方法。

41. 細胞の同定・分類・計数段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱デー

に通して、時間間隔Bで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団内に存在する溶解により生存する細胞を計数する段階；

f) 段階d) およびe) で同定・分類・計数した各白血球サブ集団内に対して、該細胞サブ集団計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、細胞崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 段階d) およびe) で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、計算した各細胞集団の細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、単位体積のサンプルあたりの、各サブ集団に元々存在する細胞の数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

44. 強い溶血剤が本質的に、i) 芳香族オキシエタノールと、ii) pKが8.5またはその付近であり、pH緩衝能を付与し且つ溶解剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と、iii) 非イオン性洗剤化合物との水溶液からなることを特徴とする請求項43に記載の方法。

45. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物

物の水溶液から成ることを特徴とする請求項43に記載の方法。

46. 計数手段を通して白血球サブ集団を計数する段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項43に記載の方法。

47. 計数手段を通して白血球サブ集団を計数する段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項43に記載の方法。

48. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項43に記載の方法。

(壊れやすい白血球を含むサンプル)

49. 壊れやすい白血球を含む全血サンプル中に存在する白血球を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) 赤血球および壊れやすい白血球を含む全血サンプルを提供する段階；

b) 全血サンプルを溶血剤と時間0で接触させて該白血球を完全かつ迅速に溶解し、サンプル溶液を得る段階；

c) 白血球を同定・分類・計数する手段を提供する段階；

請求項49に記載の方法。

51. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物から成ることを特徴とする請求項49に記載の方法。

52. 細胞の同定・分類・計数段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項49に記載の方法。

53. 細胞の同定・分類・計数段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項49に記載の方法。

54. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項49に記載の方法。

(壊れやすい白血球を含むサンプル)

55. 赤血球および壊れやすい白血球を含む全血サンプル中に存在する白血球サブ集団を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) 白血球サブ集団を同定・分類・計数する手段を提供する段

d) 段階c)で提供された同定・分類・計数手段を使用して、時間間隔Aでサンプル溶液の第一部分に存在する、サンプルの単位体積あたりの溶液により生存する白血球を同定・分類・計数する段階；

e) 段階c)で提供された同定・分類・計数手段を使用して、時間間隔Bでサンプル溶液の第二部分に存在する、サンプルの単位体積あたりの、溶液により生存する白血球を同定・分類・計数する段階；

f) 段階d)およびe)で得た白血球計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、白血球の崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 白血球崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、サンプルの単位体積あたりの、元々存在する白血球の数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

50. 強い溶血剤が本質的に、1) 芳香族オキシエタノールと、11) pKが8.5またはその付近であって、pH緩衝剤を付与し且つ溶血剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と、111) 非イオン性洗剤化合物との水溶液からなることを特徴とする請

段；

b) 赤血球および壊れやすい白血球を含む全血サンプルを用意する段階；

c) 全血サンプルを溶血剤と時間0で接触させて該赤血球を完全かつ迅速に溶解し、サンプル溶液を得る段階；

d) 該サンプル溶液の第一部分体積を該同定・分類・計数手段を通して、時間間隔Aで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団に存在する溶液により生存する細胞を計数する段階；

e) 該サンプル溶液の第二部分体積を該同定・分類・計数手段を通して、時間間隔Bで、サンプル単位体積あたりの、各白血球サブ集団に存在する溶液により生存する細胞を計数する段階；

f) 段階d)およびe)で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、該細胞計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、細胞崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 段階d)およびe)で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、計算した各細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、サンプルの単位体積あたりの、元々存在する

白血球の数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

56. 強い溶血剤が本質的に、i) 芳香族オキシエタノールと、ii) pKが8.5またはその付近であって、pH緩衝能を付与し且つ溶媒剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と、iii) 非イオン性洗剤化合物との水溶液からなることを特徴とする請求項55に記載の方法。

57. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物の水溶液から成ることを特徴とする請求項55に記載の方法。

58. 計数手段を通して白血球サブ集団を計数する段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項55に記載の方法。

59. 計数手段を通して白血球サブ集団を計数する段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項55に記載の方法。

60. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用

用することを特徴とする請求項55に記載の方法。

(流動システム(インピーダンスまたは光度計)を通過する壊れやすい白血球を含むサンプル)

61. 赤血球および壊れやすい白血球を含む全血サンプル中に存在する白血球サブ集団を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) 全血サンプル中の白血球サブ集団を同定・分類・計数するために、サンプル溶液が実質的に1細胞ずつ流動できる検出領域、その検出領域を流れて通過する細胞により発生する信号を検出する検出器、および検出された信号を処理するプロセッサを有する流動システムを提供する段階；

b) 赤血球および白血球を含む全血サンプルを提供する段階；

c) 全血サンプルを溶血剤と時間0で接触させて該赤血球を完全かつ迅速に溶解し、サンプル溶液を得る段階；

d) 該サンプル溶液の第一部分体積を該流動システムを通して、時間間隔Aで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団内に存在する溶解により生存する細胞を計数する段階；

e) 該サンプル溶液の第二部分体積を該流動システムを通して、時間間隔Bで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集

団内に存在する溶解により生存する細胞を計数する段階；

f) 段階d)およびe)で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、該細胞計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、細胞崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 段階d)およびe)で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、各細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、サンプルの単位体積あたりの、元々存在する白血球の数を判定する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

62. 強い溶血剤が本質的に、i) 芳香族オキシエタノールと、ii) pKが8.5またはその付近であって、pH緩衝能を付与し且つ溶媒剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と、iii) 非イオン性洗剤化合物との水溶液からなることを特徴とする請求項60に記載の方法。

63. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物の水溶液から成ることを特徴とする請求項60に記載の方法。

64. 流動システムを通して白血球サブ集団を計数する段階を、

サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項60に記載の方法。

65. 流動システムを通して白血球サブ集団を計数する段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項60に記載の方法。

66. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項60に記載の方法。

(インピーダンス検出器を通過する壊れやすい白血球を含むサンプル)

67. 赤血球および壊れやすい白血球を含む全血サンプル中に存在する白血球サブ集団を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) 全血サンプル中の白血球サブ集団を同定・分類・計数するために、サンプル溶液が実質的に1細胞ずつ流動できる検出領域、その検出領域を流れて通過する細胞により発生する信号を検出するインピーダンス検出器、および検出された信号を処理

するプロセッサを有する流動システムを提供する段階；

b) 赤血球および白血球を含む全血サンプルを提供する段階；

c) 全血サンプルを溶血剤と時間0で接触させて該赤血球を完全かつ迅速に溶解し、希釈サンプルを得る段階；

d) 該サンプル溶液の第一部分体積を該流動システムに通して、時間間隔Aで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団に存在する溶解により生存する細胞を計数する段階；

e) 該サンプル溶液の第二部分体積を該流動システムに通して、時間間隔Bで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団に存在する、溶解により生存する細胞を計数する段階；

(f) 段階d) およびe) で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、該細胞計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、特定の細胞集団の細胞崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 段階d) およびe) で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、計算した各特定細胞集団の細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、単位体積あたりの、各サブ集団内に元々存在する細胞の数を判定する段階を含むことを特徴とする前記方法。

〔壊れやすい細胞を含むサンプル、細胞測定〕

73. 赤血球および壊れやすい白血球を含む全血サンプル中に存在する白血球サブ集団を同定・分類・計数する方法であって、該方法が、

a) サンプル中の白血球サブ集団を同定・分類・計数するために、サンプル溶液が実質的に1細胞ずつ流動できる流動セル、光源、細胞から発する光信号を検出する光度計装置、およびその光信号を分析・処理する分析器を有する流動システムを提供する段階；

b) 赤血球および白血球を含む全血サンプルを提供する段階；

c) 全血サンプルを溶血剤と時間0で接触させて該赤血球を完全かつ迅速に溶解し、希釈サンプル溶液を得る段階；

d) 該サンプル溶液の第一部分体積を該流動システムに通して、時間間隔Aで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団内に存在する溶解により生存する細胞を計数する段階；

e) 該サンプル溶液の第二部分体積を該流動システムに通して、時間間隔Bで、サンプルの単位体積あたりの、各白血球サブ集団内に存在する溶解により生存する細胞を計数する段階；

(f) 段階d) およびe) で同定・分類・計数した各白血球サブ

68. 強い溶血剤が本質的に、i) 芳香族オキシエタノールと、ii) pKが8.5またはその付近であって、pH緩衝能を付与し且つ溶剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と、iii) 非イオン性洗剤化合物との水溶液からなることを特徴とする請求項66に記載の方法。

69. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物の水溶液から成ることを特徴とする請求項66に記載の方法。

70. 流動システムに通して白血球サブ集団を計数する段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項66に記載の方法。

71. 流動システムに通して白血球サブ集団を計数する段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、該流動セルから光散乱データを取集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項66に記載の方法。

72. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項66に記載の方法。

集団に対して、該細胞計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して、特定の細胞集団の細胞崩壊速度を時間の関数として計算する段階；および

g) 段階d) およびe) で同定・分類・計数した各白血球サブ集団に対して、計算した各特定細胞集団の細胞崩壊速度関数を時間0に外挿することにより、サンプルの単位体積あたりの、各サブ集団内に元々存在する細胞の数を判定する段階を含むことを特徴とする前記方法。

74. 強い溶血剤が本質的に、i) 芳香族オキシエタノールと、ii) pKが8.5またはその付近であって、pH緩衝能を付与し且つ溶剤の電導性を高める働きをする有機緩衝液と、iii) 非イオン性洗剤化合物の水溶液からなることを特徴とする請求項72に記載の方法。

75. 強い溶血剤が本質的に、2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100洗剤化合物の水溶液から成ることを特徴とする請求項72に記載の方法。

76. 流動システムに通して白血球サブ集団を計数する段階を、サンプル溶液が流れて通るオリフィスにかかる電気的インピーダンスを測定し、パルスの数および強さを処理して計数データ

を得ることにより行うことを特徴とする請求項72に記載の方法。

77. 流動システムを通して白血球サブ集団を計数する段階を、レーザービームが横切る流動セルにサンプル溶液を通し、流動セルから光散乱データを収集し、処理して計数データを得ることにより行うことを特徴とする請求項72に記載の方法。

78. 細胞崩壊速度の計算に直線カーブフィッティング法を利用することを特徴とする請求項72に記載の方法。

〔細胞崩壊速度情報を使用する赤血球の壊れやすさの定量的・定性的測定〕

79. 血液サンプル中に存在する赤血球集団の溶解挙動を特徴付ける方法であって、該方法が、

- a) 赤血球集団を含むサンプル溶液を提供する段階；
- b) 単位体積のサンプル溶液に対する赤血球を同定し、計数する手段を提供する段階；
- c) 赤血球の細胞溶解閾値を超えて溶血が時間0で開始するようにサンプル溶液の物理化学的条件を調整する段階；
- d) 段階b) で提供された手段を使用して、時間0から時間間隔Aで、調整したサンプル溶液の第一部分体積中に存在する単

位体積当たりの赤血球を同定し、計数する段階；

e) 段階b) で提供された手段を使用して、時間0から時間間隔Bで、調整したサンプル溶液の第二部分体積中に存在する単位体積当たりの赤血球を同定し、計数する段階；および

f) 段階d) およびe) で提供された赤血球の計数データならびに時間間隔AおよびBを使用して赤血球崩壊速度を時間の関数として計算する段階

を含むことを特徴とする前記方法。

明 細 書

細胞溶解処理条件下で異種細胞集団を正確に計数し、
感受性に関する格付けを行う方法

技術分野

本発明は、一般的には、細胞学、および細胞懸濁物に存在する特定の細胞の型の正確な分類および計数を可能とする自動装置の使用に関する。また、本発明は、細胞懸濁物に存在する細胞の型の厳密な機能上の同定および特徴付けを可能とする。特に、本発明は、他の意味では望ましいサンプル処理条件下である臨理的な方法で不安定と考えられる、細胞集団の正確な分類、特徴付け、同定および計数を可能とする方法に関する。そのような細胞集団としては、異常な細胞条件の結果、または強力な細胞溶解処理剤および条件の使用の結果（またはそのような因子の相互作用により）、突然大きな変化を受ける、壊れやすく溶解感受性を有する血液細胞が挙げられる。

発明の背景

混合細胞懸濁物の細胞集団の有無およびそのサンプルに存在する細胞の特定の型の数に関する定量的情報が分析可能であることは、先の研究者らにより認められている。この情報は、病

気の診断および特定の病状の治療の有効性をモニターするのに有用である。先の研究者らはさらに、混合細胞懸濁物に露した条件に対する細胞集団反応における検出可能な差異を利用すると、特定の細胞集団の有無を有利に示すことができることを認めている。また、これらの検出可能な示差反応を使用すると、単一の細胞集団に特有の信号を発生させることができ、その細胞集団を計数することが可能である。示差反応技術が研究されている混合細胞系としては、血液、血漿、骨髄、骨髄液および臓器の細胞懸濁物などの生理的液体ならびに植物細胞懸濁物などの細胞培養が挙げられる。そのような反応技術は、添加色素の存在下での細胞の分染法から、極端な温度、pH、毒性または化学的マイクロ環境に短時間または長時間さらすなどのストレスを課して1個以上の細胞集団の生存を停止させるものまでに及ぶ。

混合細胞懸濁物から示差反応を発生させるために課する条件の選択は、典型的には、歩み寄った中間的なものである。細胞懸濁物に存在する細胞集団同士の固有の類似性により、個別的としない細胞集団からいくつかの部分的な反応が起こることが避けられず、これが、そのような全ての種類の示差反応技術で

得られる情報の質に悪影響を及ぼしている。

哺乳類の血液は、より完全に研究された混合細胞懸濁物の一つであり、示差的細胞集団生存反応などの種々の示差反応技術を利用して分析される。全血に存在する細胞集団は、哺乳類での濃度が数百万個/ μ lである赤血球(E)；哺乳類での濃度が一般に数万～数十万個/ μ lである核のない血小板(T)；および哺乳類での濃度が一般に数百～数万個/ μ lであり、それを超える場合もある(白血球のサブ集団の場合)核のある白血球である。正常な哺乳類の末梢血の白血球はさらに、5種類の主要な型、すなわち小さいリンパ球(L)、大きい好中球(Ne)、好酸球(Eo)、好塩基球(Ba)および単球(Mo)のサブ集団に分類される。

これらの血球集団を図1に示すが、好中球、好酸球および好塩基球はまとめて顆粒球(G)として示す。白血球の主要な5種類全部のサブ集団は図6に示す。

赤血球と白血球との主要な差異の一つは、健康な場合、赤血球を選択的に破壊(または溶解)し、一方、典型的な白血球は実質的にそのままにしておく溶血剤の濃度が比較的簡単であることである。この異なる生存反応は、細胞質構造が大きく相違

することにより説明される。白血球集団の溶血を、全血サンプル中の全赤血球がこの臨界溶血濃度を超える物理化学的条件で存在させると、全血サンプル中のこれらの赤血球は、主に浸透現象、腫張現象および表面膜現象の相互作用である急速な細胞溶解性崩壊プロセスにより溶解されてしまう。そして、一般的には、白血球の全サブ集団も、それ自身の溶解性崩壊プロセスを開始すると予想される。しかし、成熟赤血球と違って、白血球(血小板を含む)は、容易に補充可能な余分の内在化細胞膜を多く有している。適切な条件下では、この膜物質が外在化し、その結果、白血球はよくらんでいく石鹸の泡と特徴を多く共有する。さらによくらむことができるそれらの石鹸の泡は、容易に補充可能な予備(非表面)の石鹸分子をまだ残している。網赤血球以上に成熟した赤血球は、もはや余分の膜物質をもっていない。その結果、白血球集団がその臨界溶血濃度に達する速度は赤血球と比較して一般に遅く、従って、制限時間内の分析条件下では、多くは白血球集団を実質上溶解耐性を有するものとみなすことができる。

一世紀以上にわたって、この相異なる細胞生存反応は、全血サンプルに存在する白血球の分類および計数を行うために無神

経に利用されてきた。もし、赤血球が簡単に溶解され、白血球および血小板が保存されるならば、数の少ない白血球サブ集団の各構成要素ごとに1万個以上もの赤血球を処理する必要がないことは、図1から明らかである。この処理負担の軽減により、全血サンプルの分析時間(およびコスト)がかなり短縮される。しかし、この相異なる細胞生存反応を1世紀前の方法の溶血剤に適用すると、非常に現実的な制限を受ける。完全な溶血を行う溶血性の強い条件の使用(いくつかの白血球が犠牲にされる)と白血球に影響を及ぼさないためのあまり溶血性の強くない条件の使用(妨げとなる未溶解の赤血球の存在のために白血球の計数が損なわれる)との間で妥協案を打ち出さなければならない。ここ150年以上、健康なヒトと病気のヒトの両方でこれらの相反する反応を同時に処理する最適な妥協条件は見出されていない。

その結果、ヒトおよび獣医の臨床用途における自動化に有益な、費用効果を有する迅速な溶血方法も、本質的には白血球溶解性(白血球・血小板溶解性)である。従って、白血球サブ集団の正確な分類および計数は妥協されることになる。溶血に伴う白血球溶解性は、計数の正確度を大幅に低下させ、白血球

サブ集団の臨床上的分類および計数の質を下げる。従って、本発明の目的は、通常使用される溶血剤および溶血条件に固有な白血球溶解活性について説明がつく(そして、計数の補正がなされる)白血球サブ集団の分類・計数法を提供することである。
壊れやすいリンパ球

白血球サブ集団の分類・計数法の臨床上の価値は、健康な体および病気の体の血液中を循環する赤血球および白血球に存在する異常を特定し、格付けする際の有用性に直接関係する。例えば、ごくまれな、しかし非常に重要な臨床上の疾患では、循環している特定の白血球サブ集団が極めて溶解感受性の高い要素を含んでいる可能性がある。この状況の例としては、特定のケースの慢性リンパ性白血病および感染性単核球症におけるような「壊れやすいリンパ球」がある。そのような臨床状態において、前世紀の形態学者たちは、血液膜の顕微鏡分析で「グンプレヒト影」を認めた。H. Begemann, J. Rastetter, Atlas of Clinical Hematology, 第4版 1989, p. 221 (Springer-Verlag) 参照。今日の化学技術者は、よごれ細胞「cancer cells」(J. Crossland, C. A. Stuart, "Granulocyte ELT 800/MS WBC in chronic lymphatic

Leukemia", *Clin. Lab. Hematol.*, 1987, 9, 371-378) または "Fandage cell" (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Leukocyte Differential Count (Proportions) and Evaluation of Instrumental Method, Approved Standard, NCCLS Document H20-A 1992 (Villanova, Pa.) を認めている。影響を受けた白血球細胞集団は、非常に壊れやすいため、膜形成プロセスのストレスを細胞に課する前に血液の小滴に高濃度のコロイド(アルブミンなど)を添加しなければ、血液膜中に保持することすらできない細胞を含んでいる可能性がある。NCCLS Document H20-A; Deans, C. W., "Eliminating disintegrated cells on hematology films", *Lab. Med.*, 12: 640-41, 1981。これらの細胞の余分の内臓物質は全て高度に分散した状態にあるため、極めて大きいコロイド活性(saccolic activity)を有し、浸透圧の低いストレス条件下では容易に回復できない。これらの細胞は、(後述する)図2の溶解前の球状体に類似する。希釈物中のコロイドのコロイド浸透圧が高いと、これらの溶解前のリンパ球の球面指数が減少する。このため、血液膜傷害過程(blood film coating process)の剪断圧低下であっても、それらの細胞は

もはや破裂することはない。

また、そのような非常に壊れやすい白血球細胞は、血液をかなり希釈して、いわゆる流動細胞計測の自動血液細胞カウンター中で数値処理する場合、細胞維持が困難である。このことは、希釈物が、妨害する多くの赤血球を溶解するよりも維持することを目的とする、明らかに平衡化された(蛋白質を含まない)生理食塩水溶液である場合ですら当てはまる。従って、これらの壊れやすい白血球がサンプル中に存在すると、循環している白血球の濃度(または白血球の全数)および白血球サブ集団の計数値を正しく知ることが本質的に不可能である場合がある。J. Cross, C. A. Stronge, "Scattered Orbits EIT 800/VS WBC in chronic lymphatic leukaemia", *Clin. Lab. Hematol.*, 1987, 9, 371-74; J. B. Dixon, "Electronic Counting of Dog Leukocytes: Discrepancies Arising From Calibration With Coulter Standard 4C and With the Honeywell Counter", *Rev. Vet. Sci.*, 31(3), 1981, 248-252; J. M. England, "An assessment of the Orbits EIT-8", *Clin. Lab. Hematol.*, 1982, 4, 137-99。

本発明は、そのような壊れやすい細胞の存在を確認し、循環

細胞を恐らく過少評価してしまうような他の計数法により白血球を計数している実験室に警告を与えるような方法を提供する。また、白血球サブ集団の正確な分類および計数を行い、それにより全白血球の計数を行う方法も提供する。これらの目的は、分析のデータ収集中の意図しない白血球溶解により生じる白血球の計数誤差を、十分厳密に補正することにより果たすことができる。本発明は、細胞の型を定性的に識別または分類する定量的データを使用することを可能にする。

溶解耐性赤血球

本発明方法によってうまく処理することができた別の重要な臨床上のジレンマは、いわゆる溶解耐性赤血球を含む全血サンプルに関する。溶解により耐える赤血球を生じる既知の条件の一群には、赤血球自体が、通常のヒトサンプルに適用可能な方法では溶解困難と思われる、例えば鎌状赤血球症、胎児および新生児の血球、ならびに他の非定型で異常生理学的な哺乳類の赤血球集団がある。他の条件または障害では、溶解を防げる妨害物質の存在により、通常のヒトサンプルに有効な溶血条件下での赤血球の溶解が困難になる。例えば、異常に高濃度の血液蛋白は、溶血剤の一部を中和し、溶血剤の物理的接近の一

部をコロイド的に妨害する傾向にある。A. Brannelgaard, J. Rygaard, "Interference by Cryoglobulins with White Blood Cell Measurements on Coulter Counter", *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 51 5, 1991, 489-492。非経口輸液、ある種の血液脂質障害および治療薬も、単独または他の物質と併用して、または異常赤血球とともに赤血球保護条件を作り出すように作用する可能性がある。

溶解耐性赤血球問題の結果、溶血しなかったり、溶血が部分的であったりすると、その影響を受けたサンプルについては白血球の計数処理全体が無効になる可能性がある。溶解せず残存する赤血球は白血球の視覚化を妨げる。ヒトの血液1 μ lに対して500万個存在する赤血球の1%が溶血しないと、5万個の非溶解赤血球が残存し、1 μ lのヒト血液に5千個の有核白血球をおおい隠すことになる。残存する赤血球が0.1%と少ないサンプルでさえ、それらを正常な血液サンプルと区別する識別信号を出す装置があり、これらのサンプル中の白血球の計数には他の方法を使用しなければならない。場合によっては計数を手動で行わなければならないが、所要時間、装置、研究室の空間、直接の作業、そして何よりも、研究室の専門的技術お

よびこれら問題サンプルの処理のために開発・維持・品質管理しなければならない複雑な手順のため、常に高コストで計数が行われる。シレンマは、溶血性の大きい物質または条件を使用して溶血を完全に行い、溶解耐性赤血球の数を減少させると、白血球溶解が非常に増加することである。従って、現在は危険な妥協が存在するが、これでは、単一の實用効果のある血液分析器で、日常的に信頼性のある溶血と白血球保護を両立させ得ない。

例えば、完全自動CELL-DYN® 1600血液分析器は、有核白血球を簡単な「弱溶解 (Soft lysis)」により大雑把にリンパ球、単球および好中球に分類し、少量の好酸球および好塩基球は溶解耐性したこれらの主要な白血球サブ集団の間に分散させるものである。CELL-DYN® 1600は一次元のインピーダンス変換器を使用しており、その白血球測定は、溶解耐性赤血球が非常に多いと無効となる。これらの問題サンプルの場合は、「弱溶解」条件下では、目的とする有核白血球の粗サブ分類も、また全有核白血球の計数すらも得られない。その結果、先天性に溶解耐性赤血球を含む多くの新生児血液のサンプルを処理しなければならない研究室では、新生児の全赤血球

を効果的に破壊するために「強溶解 (Hard lysis)」を利用する。第二の自動血液分析器を購入しなければならないことが多い。必然的に、「強溶解」は、有核白血球の細胞質も全て破壊し、実質的に均質の白血球の核のみが図1のEピークと非常に類似した、しかし66f1 (LEEV) の周りに位置する単一のピークとして残る。これらの核の分析により全有核白血球の正しい計数値を得ることができるが、これらの細胞型のサブ分類を行って、溶解耐性しているが全く有用な、図1に示すようないわゆる示差的な白血球のプロフィールを得ることはもはやできない。

この「強溶解」分析器が、典型的なヒト血液サンプルに適用する「弱溶解」用に設計されたCELL-DYN® 1600と同じであれば、その装置の品質保証アルゴリズム次第で、標準化した弱溶解による示差的白血球プロフィールに強い歪みがあると警告が鳴らされる。GLP (グッド・ラボラトリー・プラクティス) およびCLIA (臨床実験室改善法) の指針によれば、アラームが鳴れば、個々の装置について調査および注意が必要である。このシレンマに答えて、CELL-DYN社は、わずかに改良した血液分析器、CELL-DYN® 1300を市販

した。これは「強溶解」に対して効果的に作動することができる。このわずかに安価な装置は、溶解しにくい赤血球に関連する全白血球の計数問題-WBC-のみを解決するものである。しかし、これは、顧客にとっては高価な解決法である。というのは、溶血に耐える、細胞質を含まない白血球の核の純数を除く全ての白血球に関する情報をたとえ犠牲にしても、追加の装置がスペースを占有し、それが完全な保守を必要とするからである。血液凝固製剤で利用できる形態学上の白血球情報と比較しても、サブ集団について得られる単一ピークの白血球ヒストグラムに関しては、利用できる示差的または形態学的な情報は少ない。

特に言及しておきたいことは、利用価値のある「中位の溶解条件」-溶血強度がCELL-DYN® 1600の「弱溶解」とCELL-DYN® 1300の「強溶解」との間である-をまだ誰も見出すことができないことである。そのような溶解条件の選択を試みる場合、完全にむきだしになった核の領域に、部分的に溶解した好中球が代わりに移動する。これは、弱溶解条件下では、溶血した小リンパ球の領域である。このため、稀ではあるが有用な有核白血球の区別-主として細胞質が取り除

かれたリンパ球(図1の66f1 (LEEV) の周りに)、わずかに溶解して損傷を受けた好中核(多かれ少なかれ図1の顆粒球Gの部分)、ならびにLおよびN細胞残余の間にあって、同一であることが証明され、目に見えるように好塩基球残余および好酸球残余によって包囲された(これらの細胞は、血液中のかなりの濃度がここに存在する)、中位に損傷を受けた単球への区別-があやふやなものになる。

現在は、2世代のCELL-DYN® 3000装置が存在する。第一世代のCELL-DYN® 3000、1は、容易に第二世代のCELL-DYN® 3000、2に変換することができる。この第二世代のCELL-DYN® 3000、2は本発明を利用している。本発明は、第一世代装置の白血球に関する4次元の光学的情報の他に時間の次元を加えている。溶解しにくい赤血球の問題(CELL-DYN® 3000で白血球の計数を不正値にし、従って許容できないものにしていた)を克服するために、第一世代のCELL-DYN® 3000、1は、強溶解を利用するCELL-DYN® 1300もしくは1400またはCELL-DYN® 1600とセットで販売されていた。本発明を利用する第二世代のCELL-DYN®

3000.2は、等級の低い溶解装置はもはや必要としない。実際、CELL-DYN®3000.1とCELL-DYN®3000.2との相違を要す本発明では、その最も簡単な構成にもかかわらず、通かに複雑なCELL-DYN®3000Aシステムを無用のものとした。そのCELL-DYN®3000Aシステムは、CELL-DYN®3000.1より大きくなることなく単一装置内でCELL-DYN®3000.1とCELL-DYN®1300と組み合わせるものとして開発された。CELL-DYN®3000.2で表される装置の成功は、費用効果はるかに大きい。

本発明は、溶血性の強い物質および条件の使用に伴う白血球溶解を相殺するための白血球数の厳密な補正に対し対策を講じているため、溶血性の強い物質および条件の使用を可能とし、もって完全な溶血を保証するものである。本発明方法は、白血球集団が、適切に選択した溶血性の強い物質または条件の存在下では、比較的安定でゆっくりした、計算可能な崩壊速度で溶解するという実験的に得られた知見を十分利用している。それらの白血球崩壊パターンは、白血球の計数期に含まれる比較的短時間のうちに記録することができ、得られる崩壊速度を使

用すると、白血球サンプル処理サイクルの開始時に白血球溶解プロセスが始まる前のサンプル溶液に最初に存在した白血球集団の濃度を正確に推定することができる。

細胞の計数速度をモニターすることはよく知られているものの、この目的のために使用されたことはない。それは、細胞計数器の検出ゾーンの完全性または計数プロセス中に変換器を通過する細胞含有サンプル溶液の流量の安定性を評価するために使用することが多い。また、分析中の細胞が検出ゾーンを通過するとき、それらが互いに付着しないことを保証する手段としても知られている。計数速度のモニタリングは、1960年代以来、核物理学分野に対して製造されたほとんどのマルチチャンネル分析器にMCS（マルチカウントスケーリング）機能が存在したので、血球計数器の初期の開発段階では上記の目的のために使用された。これらの装置を初期の血球計数器と結合した場合、細胞計数サイクル中の計数速度のモニタリングは単純な自動操作であった (von Behrens, W. L. and Lander, Proc. Australian Soc. Med. Research, Vol. 2, p. 310, 1970)。さらに、出力は容易にプロッターに結合することができた。集団の定量的挙動を得るために経時的な速度情報を使用することは

なかった。

マルチチャンネル装置

全血サンプルに存在する細胞を同定・分類・計数する別の従来技術は、別々の多数のサンプル容器(vials)を有し、その各々で細胞アリコート異なる高度に特異的な溶解条件に付す別々のマルチチャンネル分析を利用するものである。この技術を利用する自動計測では、全血サンプルが複数のアリコートに分けられる。次いで、これらのアリコートは別々に、そのアリコート内の細胞の1種の細胞集団を除く全細胞成分が溶解するように選択された異なる溶解条件にかけられる。これらの個々のサンプルは次いで、各々のチャンネルで、各々の変換器を使用して平行して処理され、生存する非溶解細胞集団に対する計数情報が得られる。この方法は、その装置でマルチ技法を行う必要があり、ハードウェアおよび試薬が複雑になるという欠点を有する。製造・維持・品質管理費の上昇は一般に、計測および結果系の複雑さと関連する。さらに、生存する細胞集団の純度は決して保証されない。

このマルチチャンネル法を行う装置の一つはToshibaのE8000®分析器である。この装置は細胞分析用に4個のチ

ャンネルを使用する。血小板、肝臓球および好塩基球は、別々のチャンネルで計数される。リンパ球、好中球および単球は（分散した血小板、肝臓球および好塩基球と共に）、直線および交流電気インピーダンスによる視覚化原理を利用する第四チャンネルで大雑把に分類し、計測される。赤血球は、示差溶解せず血小板とともに血小板チャンネルで処理される。ヘモグロビンは、最大限の全溶血後に別のチャンネルで処理される。

TechniconのH1血液分析器は、種々に異製した血液サンプルを処理するためにたった2個の細胞変換器およびヘモグロビン計を使用するものであるが、細胞アリコートはこれらの変換器で連続的に処理され、また10種以上の異なる試薬を使用しなければならないため、少なくともToshiba/Symex E8000®と似くくりに複雑である。

CELL-DYN®3000.1Aもまた、そのような複雑な装置であるが、その改良型であるCELL-DYN®3000.2では、重要な新しい細胞分類情報を得ることができる。

本発明は、従来のマルチチャンネル型の分類・計数法よりも

かなり有益である。本発明は、より単純な装置の使用が可能であり、全ての有核白血球サブ集団の有効な多次元分離および計数に、たった1個のチャンネルとたった1種の溶血試薬およびプロセスしか要しない。下記に述べるCELL-DYN® 3000、2は、全部でたった2個の交換器およびたった3種の簡単な試薬を使用して血小板、赤血球、ヘモグロビンおよび金白血球サブ集団の処置を行う。

発明の要約

本発明方法は、その完全性を失っている不安定な希釈細胞集団の存在を、日常的に形式的に認識することができる。また、本発明は、分類とともに、これらの細胞集団の実際の計数およびより厳密な特徴付けが可能である。本発明方法によれば、細胞懸濁物の条件の調整後に、特定の細胞集団生存速度の信号が送られ、モニターされる。照射した全細胞集団は、短い時間（サンプル分析サイクルの細胞計数期）に検査または追跡され、その間に細胞計数パルスが得られる。細胞は、それらが実質的に無傷（場合によっては生存を意味する）のときに占める領域または、ゴースト、むき出しの核もしくは死細胞として分解された状態のいずれかで検査される。任意の所与の単一細胞のこ

れらの状態間の変移は突然であり、飛躍的である。なぜならば、2個の状態間の細胞の変移を感知する条件を整えることは極めて困難であるからである。また、細胞は、両方の状態において独立して、しかし同時にモニターすることができる。モニターされるいずれか、または全ての細胞集団の変移速度（無傷の状態から分解した状態への変移速度）により、有用な信号を出すことが可能であり、感度のよい同定および特徴付け情報が提供され、正確な計数データが与えられる。

本発明方法の好ましい実施態様では、信号が送られ、モニターされる細胞集団の反応は、無傷の細胞集団の崩壊速度または分解した、もしくはゴーストになった細胞残余の発生速度のいずれかである。この反応情報を使用すると、細胞集団の主要な細胞質破壊溶解がいつ生じたか、もしくは生じたかどうか、またはまだ生じているかどうかを実証することができる。ついで、この情報を使用すると、ある長大な細胞集団を同定し、分類し、特徴付けを行うことができる。確認される細胞集団変移速度も、細胞懸濁物の処理・測定中に生じる細胞集団分解の程度を正確に調べることにより、特定の細胞集団を正確に計数するのに役立つ。この分解は、細胞集団の実際の計数前に装置内で始まる

連続的な溶解プロセスにより生じる。

本発明の特に好ましい実施態様は、全血サンプルおよび白血球の計数に適用される。費用効率的な、溶血性の強い条件を使用して完全な溶血を保証し、それによって白血球の計数に対して妨害となる赤血球の悪影響を排除する。この強い溶血条件から生じる白血球溶解は、溶解に耐える細胞の数を経時的に調べてモニターすることにより、同定・特徴付け・定量がなされる。白血球溶解という事実を単に使用することにより、溶解感受性白血球の存在を見知することができ、それによると、白血球計数の他の方法のほとんどでは、白血球の全体および一部の正確な数を過少評価する傾向にある。白血球溶解の速度を使用すると、意図しない白血球溶解により生じる分解した白血球の数が調整される。

特に好ましい方法は、2個の前送方向および2個の直交する光散乱次元を利用して有核白血球を抽出・分類・計数することにより、有核白血球の5種類のサブ集団を区別することができる流動血球測定装置において有利に行われる。効率的に全溶血を行い、時間の次元を新しく使用すると、この同じ分析通路により、溶解により生き残る哺乳類の核のない血小板を評価する

こともできる。

図面の簡単な説明

図1は、等張的に希釈した全血に対して、流体力学に焦点を置いた研究用血球分析器により1973年に得られた一次元のインピーダンスデータのlog-logプロットである。T=血小板、E=赤血球、L=リンパ球または小単核細胞、G=顆粒球または多形核細胞、およびM=単球または大単核球細胞。

図2は、図4の2個の別々に記録した細胞集団図に含まれる同じ情報の積分log-log図である。

図3は、図5にも示すように溶解前および溶解後の赤血球の混合集団を生じさせるために低張的に希釈した全血に対して1976年に得られた一次元のインピーダンスデータのlog-logプロットである。

図4は、CELL-DYN® 3000、CELL-DYN® 1800およびCELL-DYN® 1300で使用されるVersa-Bioss プレートインピーダンス装置により、希釈した全血に対して同時に得た血小板および赤血球集団のデータの2個の一次元（ヒストグラム）図を示す。この装置は、前方焦点ではなく、受動後方焦点のうそを使用しているので、フィールド照

産によりゆがめられた赤血球(E_r)が生じる。これらの血小板および赤血球は分析前には溶解されない。

図5は、図4で使したインピーダンス変換器で同時に得られた溶解後の赤血球および溶解前の赤血球集団データの2個の一次元図である。図5Aは、溶解後の赤血球ゴーストおよび本質的に影響を受けていない血小板を示す。図5Bは、溶解前の球状赤血球を示す。これらのパターンは、全血を低張性食塩水中で希釈することにより調製した緩和な溶血条件下で血液を分析して得たものである。

図6Aおよび6Bは、正常なヒトの全血サンプルの寛放白血球に対する一組の四次元CELL-DYN[®]3000、2データを表す同じ対の2次元投影図を示す。図6Bは、これらの2次元投影図上に、寛放白血球の細胞の5個のサブ集団が五次元で追跡される四次元領域を示そうと試みた図である。L=リンパ球、M=単球、Ne=好中球、Eo=好酸球、Ba=好塩基球、R=残余、およびT=大きい血小板無核体および、全白血球数またはWBCの「閾値外」であるchthonicsなどの構造からの人工パルス。

図7は、CELL-DYN[®]3000装置の光学変換器の感

知ゾーンおよびフローセル領域を図式的に示す断面図である。

図8は、CELL-DYN[®]3000装置系の光学ペンチを図式的に示したものである。

図9は、溶解耐性赤血球および溶解感受性白血球を含まない患者から採った全血サンプルに対するCELL-DYN[®]3000、1により認められた白血球細胞数対時間のアナログプロットである。ストリップチャートレコーダーの記録は、本発明方法による計数速度モニターを示す。その図は、型にはまった計数期のみを使用する1個の細胞分析サイクルおよび強制による再計数を使用する2個の細胞分析サイクルを示す。

図10は、慢性リンパ性白血病患者から採った単一の全血サンプルに対するCELL-DYN[®]3000、1により認められた白血球細胞数対時間の2個のアナログプロットである。第二分析での解像では、3分の1が回収された目に見える細胞であり、3分の2が消滅した目に見えない細胞であった。

図11は、CELL-DYN[®]3000、2に対して行ったサンプル細胞サイクルの計数期に対する計数対時間のlogのデジタルプロットを示す。図11Aは、溶解しにくい新生児赤血球の4個の異なるサンプルを示す。

図11Bは、種々の治療段階にある慢性リンパ性白血病患者から採った5個の血液サンプルに対する計数対時間を示す。2個の計数期のみは、CELL-DYN[®]3000操作の強制再計数モードに拡張した。

図11Cは、異常ヘモグロビン症の二人の成人患者に対する計数対時間を示す。なお、縦軸は、解像度をより高くしてある。
発明の詳細な説明

定義

本明細書および請求の範囲にわたって多くの用語を使用するが、本発明の内容では独自の意味またはわずかに異なる意味を有する可能性がある。従って、これらの用語をここで定義する。

全体にわたって使用する「細胞集団」は、同じ細胞型のクローン的に均一な集団を意味する。血小板は、速れやすいリンパ球およびモノクローン的に同一であるとみなしうるリンパ球の集団(T細胞のサブセットなど)と同じように、前記定義の意味において均一である。赤血球も、たとえば骨髄を離れてからの時間が120日間にわたり、従ってその時間に基づく相違があるとしても、クローン的には均一である。

本発明の説明において、赤血球以外の血球集団は全て、白血

球集団の広義のサブ集団とする。なぜならば、血小板、リンパ球、単球、好中球、好酸球および好塩基球は、細胞質構造がかなり類似しているからである。例えば、血液を遠心分離すると、これらの細胞は全て、赤血球の上の白いパフーコート層に富集する(米国特許第3,914,985号参照)。同様に、図1のこれらの集団は全て、図1の全赤血球を容易に破壊する低張性の類似溶解に対して耐性を示す傾向がある。赤血球とは対照的な、全白血球のそのような表面的類似性にもかかわらず、本発明の中心となる主張は、各々の均一細胞集団が各々独自の反応パターンを有するということである。従って、たとえこの簡略化した命名法を使用しても、蓋本は、これらの白血球サブ集団細胞系の名々が自律性の明確な集団として挙動するということである。白血球サブ集団が共有する特徴は、全体としてのそれらを、数の上で優勢な赤血球集団から区別する点にすぎない。

「サンプル溶液」は、試体のサンプルを意味する。この用語は、細胞の細胞または溶解により生じた細胞の懸液を特定の方法で溶液に懸濁したり、血液または尿などの生理学的サンプルを請求の範囲の方法を実施する前に希釈または前処理しなけれ

ばならないことを意味するものではない。従って、サンプル溶液は、未希釈体液（例えば、全血、精液など）および希釈、保存、処置等を実施した液体サンプルの両方をカバーするものである。また、種々の懸濁物および細胞培養（植物細胞の懸濁物など）も含む。特定のサンプル溶液条件を必要とする方法の場合は、本明細書の中でその条件を明確に説明する。

「動的溶解 (Dynamic lysis)」は、本明細書では、ある細胞集団の反応現象を特徴付けるために使用し、この場合、大部分の細胞溶解が、その集団を含む種々の細胞群の中で、進行的速度で起こる。「動的溶解または崩壊」は、細胞数の情報を得る間、計数速度が安定して一定であると伝統的に仮定されている同定領域において、無傷の細胞の損失または細胞の残骸の出現が経時的に連続することを伝えるものである。

「サンプルの単位体積当たりの細胞数」は、本発明方法に従って得られる計数データの種類を示すために使用する。計数手段は典型的には、検出器の感測場の信号検知部を通過する細胞事象の検出可能な数の計数を行うことを充分理解すべきである。この生データ情報はやがて分割され、単位時間当たり、分析される体積当たりの細胞事象の計数を与える。通常利用される計

数手段は、一細胞ずつ検出器の中を流れるように、元のサンプル溶液の真実的な希釈を必要とすることが多いため、生の計数情報は元のサンプル溶液の単位体積当たりに反して相関させ、計数情報を臨床的に価値のあるものとする。従って、実際の計数データは、元のサンプル溶液の単位体積当たりの細胞数を得るために、希釈度または試薬添加を考慮して処理する。すなわち、本発明の範囲は、細胞を計数し、細胞を同定する方法を包含し、その方法は、無傷の細胞に関する通常の安定な定量的情報に基づいた計数データを利用するものである。

「細胞溶解」は、細胞を保持している条件がその細胞溶解閾値を超えるときに生じる。その閾値は、細胞のマクロ環境およびミクロ環境の物理化学的関数である。その結果、細胞溶解は、細胞を、細胞溶解閾値を超える細胞を生じる物理化学的条件を特徴とする溶液または環境に故意にさらすと生じる。細胞の細胞分析サイクルの計数期に細胞集団の構成員が細胞溶解を受ける程度および細胞溶解が生じる速度は、ある細胞型の存在の同定、ある細胞型における異常の存在、および進行性の動的溶解を受けていることが認められる分析される細胞集団内での初期の細胞数の正確な計数に対して有用な情報を提供する。

細胞溶解を招く純粋に物理化学的な条件が多く知られている。溶液のイオン強度、pHおよびコロイド浸透圧 (osmotic and oncotic pressure) が細胞保護を高めたり、細胞溶解を引き起こす条件をつくり出すことは公知である。さらに、温度は、細胞溶解速度に対して強い影響を有する。本明細書では、この細胞溶解の原因となる物理化学的条件に関する伝統的理解を拡張して、自動計数装置に存在して不注意に細胞溶解を引き起こす可能性のある溶液処理条件も含める。これらの条件には、装置の流体部分に存在する一様に激しい混合または一定の攪乱またはせん断応力が含まれる（例えば、米国特許第3,871,770号に記載）。さらに、特定の細胞型に対して細胞溶解性を示す、細胞膜に損傷を与えたり細胞膜を変形したりする公知の溶解剤がある（例えば、米国特許第4,962,038号；欧州特許出願第444,241号）。他の試薬および条件は、当業者には周知である。

細胞集団反応、細胞溶解および細胞計数は、本明細書では、従来の装置のこの問題における一次的、すなわち細胞の直接的可視化の概念と明確に関係する。この「細胞の直接的可視化」は、特定の信号 (signal) に対する細胞集団の反応の間

接的検出と対比することができる。この二次的な細胞検出は、本発明を、関連する従来技術と明確に区別するものである。さらに、特定の細胞懸濁物に対してある細胞計数法を選択する場合、間接的検出の細胞計数事象は、直接測定可能な信号を生じる特定の条件下で生じる。例えば、電気インピーダンスによる細胞の測定では、所定の細胞懸濁物条件および電気信号条件を使用して、細胞懸濁物中の特定の細胞の存在を示す測定可能な信号を得る。「観察窓」は先に観察された反応に基づいて選択され、計数事象は通常、この窓内に導かれる。

溶解性溶液条件および有効な電気信号を顕現する条件に対する細胞集団反応は、以前は窓窓に反するもので（現在は制御し得る）、現在は、その溶液条件または信号条件を変えることにより系統的に変えることができる。細胞の溶解反応が生じると、細胞の残骸またはゴーストにより生じる潜在的な信号が初期の観察窓から移動する可能性があり、その結果、モニターされる集団が全く見えなくなり、従って初期の観察窓には存在しなくなる。実際、無傷の細胞集団の反応は、溶解を受けると一つの場所から消えるが、得られる細胞残骸、残骸またはゴーストの反応が全く離れた場所に現れる可能性がある。この方法では、

理した条件に反応した細胞集団の損失または崩壊の「視覚化」または測定の際に、他の観察窓における細胞残骸の出現を「視覚化」または測定することもできる。すなわち、所与の領域でモニターした「崩壊」速度は、実際には正である可能性すらある。そのような正の崩壊速度を説明するある機構では、細胞残骸の局所的な増加および離れた所での無傷の細胞の数の減少を含む。別の機構では、細胞内の主要な変化（膜位または内部ゾル膜成分のエネルギー変換ゲル膜への析出など）を含むとともに、以前には検出できなかった細胞が突然、可視細胞に変移することも含む。

本発明では、この相対的可視性における累積的変化の概念を、赤血球破壊テスト中に動的溶解を受ける赤血球集団に関しての、容易に得られる一次元インピーダンスデータによって説明する。提示された種々の考えを伝えるために、図1～3ならびに図4および5の内容を以下で詳しく説明する。図1～3の両対数データは、流体力学に焦点を置いた研究用血球分析器により1970年代に得られ、Clinical Research, 1976, 22 page 1224に記載されている。図4および5のデータは、CELLE-DYN[®] 900～CELLE-DYN[®] 3000のCELLE-D

YN[®]装置系で使用されている、赤血球/血小板インピーダンス装置の1種により得たものである。これらのインピーダンス装置は、流体力学上の前方集束 (front focusing) を使用しておらず、臨床データの表示は線形である。しかし、他の点では、基本となる可視化装置は、1970年代の研究装置ならびに1980年代および1990年代の臨床用CELLE-DYN[®]装置で特に差はない。図1は、希釈された抗凝固全血におけるインピーダンス感知により可視化される全血球を示す。図1の文字は、血小板 (T)、赤血球 (E)、リンパ球 (L)、顆粒球 (G: 好中球、好酸球および好塩基球) および単球 (M) の頻度分布を表す。

慣例により、既知容積の球状ラタックス粒子を使用して、EDTAで取り巻いた血小板のインピーダンスの大きさのヒストグラムを決定する (図1および4A)。これらの粒子はまた、比較的硬い球状白血球のインピーダンスの大きさのヒストグラムを積量化するためにも使用する (図1; L, GおよびM)。こうして、これらの細胞のLeitz Equivalent Electric Volume (LEEV[®] f1) において検出の検量が見られる (von Behren, 1975 Meditations

Macrothrombocytopenia, Blood 45:199)。これらのLEEV[®]検量プロフィールは、図1の濃い影の部分である。

そのようなラタックス球は、赤血球のインピーダンスの大きさのヒストグラムを大雑把に積算するためにも使用される。しかし、赤血球は非回転楕円形に、変形しており、とりわけ先に挙げた物理化学的変数に対する赤血球の容積反応の影響が大きいため、この大雑把なラタックス検定を臨床レベルに高めるには、複雑な形状因子を使用しなければならない。この形状因子補正は、暗黒のうちに、形状因子、収縮または膨張因子および電場変位項を含む。しかし、この形状因子は通常、明確にコンピュータ計算されるわけではない。そのかわり、血液分析器では、LEEV[®] f1、すなわち赤血球等価電気容積 (Erythrocyte Equivalent Electric Volume (Leitz)) が直接換算される。この正確な目盛りの確立については、下記のCELLE-DYN[®] 3000装置系の血小板および赤血球集団パラメータという見出しの箇所で説明する。

多くの血液分析器では、LEEV[®] f1がLEEV[®] f1と約1.5倍異なる (von Behren 1975前出)。このことは、図4Bおよび図1に見られる血小板がLEEV[®]単位ならば、その

大きさが容積にして1.5倍大きくなることを意味する。この変化は、図4Aおよび4Bのデータの両対数表示である図2において明らかである。

図1の薄い影をつけた赤血球曲線は、下方の横軸が一般的な球容積を表し、上方の横軸が一般的な球の直径を表すように、実際は、その元のパルス位置から1.5倍だけ右に移動させた。その結果、赤血球はLEEV[®]で表わされている。

十分な有核白血球 (すなわち、L, GおよびM) を得て、図1の2,500個/ μ lのリンパ球および3,100個/ μ lの顆粒球の実際の分布を図示するために、本発明者らは、610万個の赤血球および187,000個の血小板を処理しなければならなかった。この処理は、46分を要した。

上記で強調したように、市販の血液分析器は「スピードの必要性」のため、図1の両対数曲線のピークを大体の中心とする各々の意で赤血球、血小板および有核白血球を個々に処理する傾向にある。例えば、赤血球は図2および4Bに示すように見ることができる。すでに述べたように、図2は実際は生のデータではなく、図4A (血小板; 図2の濃い方の曲線) および図4B (赤血球; 図2の薄い方の曲線で、図4Bの数の上で少な

い血小板も示す。)の生データを両対数表示したものである。

図4はまた、臨床用CELL-DYN[®]3000、1インピーダンス変換器において得られた細胞データに対する2個の容積ヒストグラムを示す。図4Aは血小板を示し、図4Bは赤血球を示し、それらは、ルーチン計数サイクル中に計数した。両方の図で垂直の点線は種々の細胞集団の計数境界(即ち図表に便利な意)を表す。図4の2個のヒストグラムを対比すると、赤血球ヒストグラム(4B)の垂直の点線以下の領域は、少数の血小板を示す。血小板ヒストグラム(4A)は、赤血球ヒストグラム(4B)の左側領域に示されるのと同じ血小板集団に関する情報を報告するものである。しかし、図4Aのデータは、かなり小さい振幅を示す。換算単位(すなわち、LEEV対EEV)の相違の他に、図4の2個のヒストグラムは、それらの横軸の及び幅が大きく異なる。赤血球ヒストグラムの広い意と対比して、血小板のヒストグラムの意は約5倍狭い。

赤血球ピークの右側の肩(図2および4AのE。)は、装置に起因するもので、フィールド振幅調数として知られる(see Lehren and Edmondson; J. Biotechn. Cytochem 24: 211-216 1976)。焦点の合っていないインピーダンス系に見ら

れるこの赤血球に生じた肩は、図1の希釈した全血に存在するリンパ球、顆粒球および単球がたとえ高濃度であったとしても、これらの白血球をかなりおおい隠すであろう。明らかに、図1の優位を占める赤血球集団が簡単に溶解される(その結果、完全に消失して見えなくなる)ならば、両対数の図に示した数少ない血小板および真膜にまれな有核白血球が、便利で費用効果的な迅速分析処理を受けやすくなる。

残存赤血球ゴーストが検知できない程度の全溶血を可能にする溶血剤(サボニンなど)がある。しかし、直接的な細胞可視化および間接的な細胞検出という考えを発展させるためには、低張性溶液による血液希釈を使用して赤血球の膜系で起る反応を促すことが好ましい。こうすると、赤血球の体積が膨張し、破壊している元の両凹型の赤血球円板と同じ膜表面積を有する球形の球になる。低張性がより強くなると、赤血球は突然、「消失する」か、図4Bのものと意において電気的に「不可視」になるように見える。細胞の可視性が飛躍的に変化するの、膜が電流および赤血球細胞質を含むヘモグロビン分子の溶液に対して突然多孔性になるからである。溶解前の赤血球は、突然、溶解後の赤血球ゴーストになる。そのとき、電流は、実質的に

細胞の周りよりも細胞の中を流れる。しかし、図5Aおよび3に示すように、赤血球のゴーストまたは基質構造は信号を出す。とはいっても、その電気的大きさは、伝統的な臨床上の赤血球の体積および計数情報を得るために使用する標準的な観察条件下では、赤血球からの信号より何倍も小さい。計数プロセス中、赤血球ゴーストの信号は、図5Aおよび3に示すように、血小板サイズの領域に現れる可能性がある。

溶解前の赤血球のヒストグラム(図5B)は、0~384の範囲の「gated out」f1(LEEV)のデータを示す。血小板の小さい集団は、図5Bの垂直の点線の左側にあって、観察領域の「gated out」である。図5Aでは、この「血小板領域」が観察領域であり、高増幅、従って高分解能で目盛られている。この場合、赤血球ゴーストが優勢であることがわかる。図3のグラフは、予期される血小板領域における細胞集団の性質の組み合わせを示す。図5Aの比例的縦座標では、血小板集団はほとんど無視される。図3の対数の縦座標ではそれが明らかである。しかし、本明細書で使用されるように、血小板は図5Aでは明らかに目に見える。それらは変換器および回路によって認められ、示された。他方、図5Aの赤血

球ゴーストは、図5Bでは不可視であった。細胞は位置的に飛躍的な移動または変移を受けた。この優位を占める赤血球ゴーストの集団は、赤血球に対する低張性条件の溶解効果のために古典的な血小板領域に現れ始めた。

実際、図1および3で使用したものと同一装置により、赤血球の飛躍的な移動にもかかわらず、図3の細胞構造全体を同時に計数することができる。そのような観察条件下では、本発明で開示する崩壊速度が0とかなり異なるときはいつも、観察される異種集団全体の細胞の平均の大きさが連続的に減少することは当業者には明らかである。飛躍的な溶解細胞分解の広いダイナミックレンジにわたって特定の平均パルス大きさをモニターすることは、間接的または二次的な細胞の可視性変化の別の形に通じない。

この可視性の概念を、ここでは、規範的な一次元の環境から多次元の空間に拡張する。

図6Aは、全血サンプルの有核白血球の同じ四次元データを表す2個の異なる2次元投影を明示したものである。これらのデータは、CELL-DYN[®]3000、2から得たものである。図6Bは、これらの同じ投影を、5つの領域の大雑把な二

次元表示を行うために書き入れた線と共に図示するものであり、無傷の有核白血球のサブ集団は、それらの領域で、その数値の計数期の間、四次元空間的に追跡される。領域Lにはリンパ球が存在する。領域Nは好中球を含む。単球は領域Mに存在する。領域Bは好酸球を含む。好塩基球は領域Bに存在する。大きい血小板は凝集し、thrombocytesは領域Tに現れる可能性があるが、溶解により生存する血球構造の全体には含まれない。

領域Rは、このサンプルに対して無視できるデータが得られる場所として図6B上に表示される。これらの分析条件下では、有核白血球はこの領域で視覚化されない。本発明で図示する方法によれば、白血球残余、ゴーストまたは核が通常は認められない領域（例えば、領域Rなど）に出現することを使用して、課した条件に対する特定の細胞集団の反応を測定することができる。一定の領域における細胞残余、細胞ゴーストまたは細胞核の出現速度は、処理時間0、すなわち測定可能な反応を得るための条件を課す前にサンプルに最初に存在する細胞の数を測定・特徴付け・分類・計数するために使用することができるパラメータである。

モニターされる細胞応答速度

けることは、多段階法を使用して同じ結果を達成する従来の方法とはかなり異なる。例えば、米国特許第4,040,742号および同第3,606,539号を参照。本発明方法によれば、そのような測定を単一の透過性 (leakility) で行うことが可能である。

本発明の別の実施態様では、サンプル溶液に存在する第一細胞集団があり、その第一集団はいつでも作ることができ、特定の溶解剤の添加またはサンプル溶液の物理化学条件を変えることによりその細胞型の細胞溶解閾値をかなり超えた場合は全細胞溶解を迅速に示す。細胞溶解後は従って、この第一細胞集団は、この型の無傷の細胞の領域での細胞の計数機構に対して確實に見えなくなる。同じサンプル溶液に存在し、第一細胞集団よりも複雑であるか異なる細胞質構造を有する第二細胞集団は、これらの条件下では、同様の非常に急速な全細胞溶解は示さないが、進行性でゆっくりした（動的）溶解を示す。例えば、赤血球以外（および同様の構造を有する細胞成分以外）のほとんどの型の細胞は、広範囲にわたる水和により膨張する傾向があり、余分の内在化した細胞膜が次第に外在化する可能性があるため、これらのいわゆる「最小球 (minimal cells)」

本発明は、その最も広い概念において、他の細胞集団から独立した1個の細胞集団における細胞または同じサンプル溶液に存在する不活性なモニター粒子を測定・計数する方法を提供する。本発明は、種々の細胞集団の生存特徴をモニターすることにより、ある細胞集団内の細胞を測定・特徴付け・分類・計数することができる。次いで、これらの特徴を使用することにより、測定可能な反応を引き出すための条件をサンプルに課す前のサンプル溶液に元々存在する細胞集団に関する定量および定性的情報を引き出すことができる。モニターされる細胞の生存反応は、図6Bに示すような無傷の細胞の直接的な消失または図5Aに示すような細胞の構造、残骸、ゴーストもしくはは残余の出現（すなわち、無傷の細胞の間接的な消失）のいずれかであると考えられる。

本発明方法は、赤血球の壊れやすさの測定および特徴付けに有利に適用することができる。細胞溶解過程中、経時的に赤血球数をモニターすると、問題の赤血球集団に関する定量および定性的情報が得られ、それは、診断およびそれに続く病気の治療に有用であると考えられる。

本発明方法を使用して赤血球の壊れやすさを評価し、特徴付

よりも溶解する傾向が小さい。この第二細胞集団が関係する時間持においてともかく溶解を示すという事実およびこの第二細胞集団の溶解が起こる割合は共に、無傷の第二細胞集団細胞、細胞ゴーストまたはその両方を計数することによりモニターされる。計数は、第一細胞集団の完全細胞溶解を生じるサンプル溶液の物理化学的調整後に始まる最小限の少なくとも2回の異なる時間的間隔において行う。

次いで、第二細胞集団の反応または崩壊速度をモニターして得られた情報を使用して、第二細胞集団中の崩壊細胞の存在を特徴付け、影響を受けた細胞集団をさらに特定して測定する。この情報はまた、第一細胞集団を溶解するためのサンプル溶液の物理化学的調整が起こった時点と分析サイクルの実際の計数期の始まりとの間に生じた不注意による第二細胞集団の溶解に対して補正することにより、第二細胞集団に最初に存在する単位体積当たりの無傷の細胞数を正確に推定するために使用される。この第二細胞集団の不注意による特定の溶解に対する一時的な補正により、第二細胞集団の計数の正確性がかなり改善される。このことは、単に第二細胞集団の計数情報の臨床上の価値を高めるだけでなく、第二細胞集団に関する、可能性の大

きいどんな重要な計数も実際に可能にすると考えられる。

別の態様では、本発明を、関連する進行性の飛躍的動的溶解を共に示す少なくとも2種類の集団を含むサンプル溶液に適用する。各集団の各細胞は、可視性において突然大きな変化を受けるが、集団全体がほとんど即座に溶解するわけではない。溶解は、サンプル溶液に存在する物理化学的条件の調整に応答して、異なる溶解または崩壊速度で生じる。崩壊速度および/または細胞残余の発生速度をいわゆる多区分または集団特異的にモニターすると、すぐに適用される有用な情報が得られる。

飛躍的集団が細胞である場合、この方法は、サンプル溶液の簡単な希釈により1個以上の細胞集団に好ましい細胞溶解条件を作ることができるので適用可能である。この方法はまた、自動計数システムに残存するサンプル処理条件により不意に動的飛躍的細胞溶解が生じる場合にも適用できる。この方法はまた、溶解剤をサンプル溶液に添加して1個以上の集団の進行性動的溶解を開始させる状況においても適用できる。各々の細胞集団の進行性動的溶解は、溶解開始後の種々の時間間隔において全てのデータを得ることによりモニターする。溶解により生存する細胞が細胞集団に特異的な数で発生すると、集団に特異的な

崩壊パターンを利用して特定の細胞集団のある性質を定量化することができる。これらのパターンの範囲は、崩壊速度0（または無視できるほど小さい）から非常に大きく、臨床的にかなり重要な速度にまで及ぶ。そのような速度およびパターンは、ある疾患に対しては特徴的である。さらに、特定の細胞集団の計数のモニターデータを使用すると、正しく分類し、サンプル溶液を調整して細胞溶解を開始する前のサンプル溶液に最初に存在した各細胞集団の細胞の数を正確に推定することができる。

本発明方法は、骨髄、全血、血漿、脳脊髄液、関節液、精液および臓器細胞懸濁液などの生理学的試体の示差的細胞分析に有利に適用することができる。また、培養に懸濁した植物細胞培養、有枝植物細胞構造との懸濁物における植物細胞および海洋中の有機体の懸濁物などの他の異種細胞懸濁物にも適用できる。本発明は、溶解細胞集団の減少および数分以内の即時測定を用いるシステムにおいて有用である。溶解により生存する細胞のその後の成長形態において示差的細胞集団反応を誘発するために溶解後に数時間のインキュベーションまたは培養を行う方法は含むものではない。また、本発明は、存在するバク

テリアを飼って培養するために血球を微生物学的に溶解する方法を含むものではない。

赤血球-白血球系

好ましい態様では、本発明は、全血サンプルに存在する白血球サブ集団の分類、特徴付けおよび計数に有利に適用できる。上述したように、赤血球-白血球系はかなり研究されており、特に全血を使用して白血球を処理する方法は周知である。

また、どの溶血性希釈剤も幾分か白血球溶解性であり、特に溶血条件が強い場合はそうである。そして結局は、一定の白血球集団の細胞が、あるとき、それらの特定の溶血閾値を超える。細胞計数システムが、予想される無傷の白血球の存在を記録するために組み立てられる場合、均一な白血球サブ集団内の各崩壊細胞は、その計数システムの通常の領域で見ることができない結果、失われる。これらの白血球細胞は、溶解感度に関して示差的挙動または相違する成熟を示すので、あるとき、それらの溶血閾値に達する。サブ集団の真には、その集団を代表する典型的または中位の細胞よりかなり感度が高いものもある。臨界感度がかなり小さい。これらの白血球集団の重要な特徴は、それらが溶解の処理を受けると、どの特定集団も、延長された

時間にならって測定可能な無傷の細胞の消失または細胞残骸の発生を連続して示し、この連続した崩壊または発生プロセスを用いた特定の細胞溶解条件下で、この特定の集団に対して特徴付ける重要な特定の速度情報として提示するために使用できることである。この特定の速度情報は、最初に存在した無傷の細胞集団を正確に計数し、分類するために使用することができる。また、この特定の速度情報は、病気の分類、従って患者の治療および患者の臨床管理において臨床重要である細胞集団の、先に測定できなかった性質を特徴付けるために有用となる。

例えば、多くの壊れやすい細胞を有するサブ集団の細胞を含むと言われるサンプルでは、壊れやすい細胞とともにその細胞集団全体を含む種々のコホート (cohorts) のこの連続した動的示差挙動が保存される。言い換えると、そのサブ集団全体は、顕微鏡下で区別される明らかに壊れやすい細胞だけでなく、変化した特定の挙動パターンを有する。これらの壊れやすい細胞は氷山の一角のようである。氷山は、「常に目に触れる以上のもの」がある。同様に、感受性のあるサブ集団の不規則性または疎離される不均一性に対して均一性も存在する。この均一性ものは、長年、本発明者の一人が研究してきた血球

集団均一性と類似する（例えば、*Heterogeneous Heterogeneity of Placental Populations*, W. E. van Ockere, Proc. Acad. Soc. Med. Exp. 2:339, 1978）。しかし、本発明ではそれを、信頼性のある細胞計数の困難なプロセス中の、生か死か、一か八かの動的予測現象として初めて利用するものである。影響を受けるサブ集団細胞クローンはどのコホートも、溶解耐性もしくは影響を受けない細胞クローンまたは典型的な白血球由来の対応するコホートよりも溶解に対する感受性が大きい。これは、クローナル集団の単一の均一崩壊速度パラメータの物理的解釈である。従って、これらの全血サンプルの完全溶血が行われ得る一方で、分析器によって白血球数が得られる信号の発生期中に壊れやすい白血球サブ集団が進行性の動的溶解を受ける可能性がある。（暖かい赤道の水での氷山の消失に要する時間は、目に見える頂上の大きさに単に比例する。この消失時間は、最初の頂上を溶解するのに要する時間よりはるかに長い。）分類可能な均一集団の進行性溶解の間の2個以上の時点で集団細胞の計数データを取ると、集団の崩壊または細胞溶解の発生の数学的表示が得られる。

一方では、この数式化またはパラメータ表示を使用して、溶

解性に反映されると結論づけられる。本発明方法に従って分析される、少数の壊れやすい細胞を示す細胞集団（例えば、慢性リンパ性白血病患者のリンパ球集団）を含むサンプルは、「悪性の」血液皮膚に認められる少数の壊れやすい細胞ではなく、細胞集団全体が、変化した運動パターンを示す。本発明者らは、血液サンプルのどのサブ集団のどの細胞も、*in vitro* 血液保存中に同様に影響を受けて悪性血液皮膚を生じるが、保存血液サンプル内の種々の白血球サブ集団が損傷を受ける速度には相違があることを知っている。また、新しい血液サンプルにおいて、血液皮膚に少数の「ストレスにより開発される」壊れやすい細胞を示すクローナル細胞集団のどの細胞も、血液皮膚調製物のせん断応力下で壊れやすい細胞を示さない、影響を受けない白血球集団（例えば好塩基球または好酸球）の対応する細胞に比べて溶解に対する感受性が大きいことを知っている。もちろん、白血球分化の初期段階では、クローナル異常もある。従って、全血球の特細胞レベルでの突然変異は、ちょうど、不十分な抗凝固法および不利な血液保存条件が多くのサブ集団に同時に影響を及ぼすように、いくつかの白血球集団の溶解特性に同時に影響を及ぼすことができる。

本発明は、多くの異なる細胞系および多くの異なる細胞検出

解が始まる前のサンプルに最初に存在するサブ集団全体の数を正確に推定することができる。これは、崩壊速度（または発生速度）を分析プロセスの時間0に外挿することにより行う。この時間0は、溶血を開始するためにサンプル溶液に溶血剤を添加した時間、またはそのサンプル溶液の物理化学的条件の調整を行った時間として定義し、知られている。他方では、このパラメータ表示により、細胞分類および病気の診断の両方において有用な新鋭情報が得られる。

本発明を要す、細胞のサブ集団またはクローナルが均一に挙動することは、一般的な生物学的原理の認めるところではなく、むしろ、信頼できる細胞計数に関する実験室での日常的研究の難に、飛躍的な時間的に相違する生存溶解の関係において利用されるものである。

本発明によれば、細胞の溶解または崩壊速度は、細胞の純粋または不均一な懸濁液に含まれる種々の細胞（氷山の頂上または雪片）よりもむしろ細胞の集団全体（氷山全体）に起因するものであり、それに対して計算される。これは、同一の均一なクローナル集団内の細胞同士の間接的類似性が高いために可能である。無数の研究から、この構造的類似性は、そのような集団の細胞同士の予測的溶解反応が実験的に測定された細胞的類似

系に有利に適用される。本発明は、細胞を希釈する公知の細胞分類法のほとんどを使用して行うことができる。この方法はまた、均一で特異的なクローナル細胞の崩壊または発生速度の測定および使用に依存しているため、新しく開発される細胞分類法にも将来適用できる。これらの速度を得る操作は、細胞型および細胞計数法に依存しない。本発明は、細胞集団を同定、特徴付け、分類および計数するための細胞の大きさの測定値として電気インピーダンスを使用するもの（例えば、Coulter S Plus IV Blood Cell Analyzer および CELL-DYN® 1000 Blood Cell Analyzer のインピーダンスおよび光学変換器モジュール）などの自動細胞計数装置において行うことができる。

例えば、本発明は、細胞集団の分類・計数を行うために選択的蛍光染色法または標識および光散乱または吸収現象などの光学的流動血球測定法を用いる装置において行うことができる（*Cytometry*, 3: 65-74, 1992; Becton-Dickinson FACScan and FACSort systems and Abbott CELL-DYN® 1000および4000シリーズの装置）。この装置の列挙は、本発明方法による細胞の同定、特徴付け、分類および計数のために使用できる方法を例示するためのものであって、これらに限定されるものではない。光学、電気抵抗、電気容量、超音波および他の多くの

細胞を感知するための原理は、同時または逐次的に全てを結合させて、流体の各要素の、信号を発生する細胞または細胞構築物の有無（出現または消失）について質的応答することができる。これらの構造は、無傷の細胞、凝結細胞、種々の分解段階にある死細胞、溶解プロセス開始後に放出される細胞成分、有核細胞残骸、核を含まない細胞残骸または古典的な細胞ゴーストおよび、特に植物の場合は細胞の液胞が考えられる。それらは、粒状の、妨害する構造または関与する構造であってもよく、それらは、別の観察窓に見えたり、見えなくなったりする。

記載したこれらの計数システムは、本発明の原理を説明するための便利な手段として役立つに過ぎない。ある方法によれば、少なくとも2個の集団を含むサンプル溶液を計数装置にかける。次いで、ある試薬を加えて一方（第二）の細胞集団の完全細胞溶解を誘発し、別の（第一）細胞集団の細胞の同定、分類および計数を行う。第一細胞集団の崩壊パターンの測定では、通常、溶解誘導試薬をサンプル溶液に添加する時を、細胞処理サイクルの時間0として指定すると都合がよい。ある公知の計数装置では、希釈し、溶解したサンプル溶液を、本質的には一細胞ずつ検出部に渡し、第一細胞集団の細胞の細胞型および細胞数に関連した信号を測定する。

細胞構造に関して集められる。特定の時間間隔の間、自動装置は発生した全信号を使用して、検出部を流れる目に見える全細胞構築物に関する計数情報を保存し、提供する。これらは、別々の体積の希釈サンプルに存在する第一または第二細胞集団のいずれかに属する。サンプル分析サイクル（図9および10）の計数期のA部分の間、各細胞集団の生の計数データを使用すると、単位平均時間A当たり、単位体積当たりの細胞数が得られる。次に、計数期の後の平均時間Bに検出部を通過する希釈サンプルの第二の別の体積の分析に基づいて、単位体積当たりの細胞数がその装置から得られる（図9および10）。この計数操作は、サンプル溶液が検出部を通過するにつれて、計数期の間、短い時間間隔で繰り返してもよい（図11）。サンプル希釈度および他の試薬の添加に関する生データに対して調整をする。

次いで、平均時間AおよびB（および所望により、その後の時間）に得られた細胞計数値を使用して、観察データの点を通る曲線を作り、その曲線を細胞分析サイクルの時間0に延ばすことにより細胞崩壊速度を計算する。細胞崩壊速度を得るには、確かに、平均時間AおよびBでの計数より多くのデータポイント

しかし、溶解誘導試薬を最初にサンプル溶液に添加した後、即座に、希釈し、溶解したサンプルが信号検出部を流れ始めるわけではない。理想的には、第二細胞集団の溶解を完全にすべきであるが、希釈し、溶解したサンプル溶液が検出部を流れ始めるまでに第一細胞集団の崩壊がいくらか不注意に始まってもよい。伝統的に、正確に知りたいことは、第一細胞集団（白血球）の数値による細胞濃度である。このために、目に見える各々の細胞集団の挙動を逐時的に観察し、計算する。第二集団の無傷の細胞および目に見える可能性のある残骸は、第一細胞集団の数値による測定精度の正確さを保証するために必要な情報以上に発見的な情報を提供する可能性がある。

一定流量条件を血球計数器または分析器に設けると、信号検出器が目に見える細胞構造によって生じる信号を捕獲する。これらの信号は経過時間信号を含み、検出部を通過する各々の細胞構造（または結果としての細胞群）を独自に同定する。この信号発生および検出期は、計数期開始後のある時間にあたって終結する。検出部を連続して定常流量で流れる希釈サンプルの信号発生・検出期の間、サンプルの単位体積当たりの計数データが、2回以上の間隔を置いた計数期中に視野内にある全

トを使用することが考えられる。2個の点および単一の崩壊細胞集団は、有用な曲線あてはめ法の最少条件を満たすに過ぎない。速度関数は、サンプル溶液に最初に存在する細胞集団の正確な計数値を得るために、サンプル分析サイクルの時間0に外挿される。所望の細胞の不注意による溶解または妨害する細胞の不完全な溶解のために崩壊速度が重要（正または負）であるときはいつも、試薬添加により不正確になる細胞計数値をこの外挿により補正する。この補正は、無傷の細胞に対しては意味のある（0でない）負の崩壊速度を利用することができ、分解した細胞、細胞ゴーストまたは残骸などの細胞構築物の出現に対しては、意味のある（0でない）正の発生速度を利用することができる。関与する最初の細胞に対する崩壊速度の概念は、これらの変移速度—出現および消失—の両方を含むものである。

細胞の型および数の指標として種々の細胞感知原理（光散乱データなど）を使用する従来の流動血球測定装置には、改良して検出部を通過する各細胞のデータのリストに時間要素を加えることができることがわかった。次いで、この「時間ラグ（time lag）」を使用して、細胞処理サイクルの時間0に不安定集団に存在する細胞の数の計算を可能にする細胞崩

増速度を計算する。

しかし、そのようなデジタルデータ処理は本発明の実施に必須ではない。図9および10に示すように、作動している標準流動血球測定器の適切な細胞溶解モード下では、適切に調製したサンプルに関する連続的な2個の計数により、本発明の実施に必要な最小の情報が得られる。以前、図10の第一分析によって示される「不安定な」計数条件は、ぜひとも避けなければならなかったが、これは不可能であることが多かった。現在は、そのような非常に恒常的な不安定性を、図10の第二分析で示すように系統的に利用することができる。

全血サンプルに存在する白血球細胞集団の同定、特徴付け、分類および計数に関して、本発明の好ましい態様を記載する。この細胞系はかなり研究されており、本発明は、既存の血球計数システムに重要な強化を与えるものである。これらの強化は、計数データの正確さを改善することによりこれらのシステムの能力を伸ばすものである。本発明はさらに、細胞崩壊および/または細胞崩壊速度の利用に基づいて、ある異常な細胞型または条件の同定を可能にする。

非常に高価な方法に頼ることなく、赤血球の存在下で白血球

集団を計数するためには、第一に、図1で単位を占める多数の赤血球を溶解することが必要である。これは、比較的単純で、費用効果のある抽出原理を利用してあまり多くない白血球集団の可視化を可能にするために行う。しかし、赤血球をより溶解耐性にする条件が存在する。上記ですでに述べたように、赤血球は、ヒト胎児、ヒト新生児、ヒト以外のある種の哺乳類、ヘモグロビン障害患者および高血色素白蛋白度の患者から採った血液サンプル中では溶解がさらに困難である。赤血球の溶解耐性は、未溶解赤血球がセンサーを覆す傾向にあるため、不十分な溶血は不十分な白血球計数情報をもたらし傾向にあるというグレンマを生じる。他方、完全な溶血を行うために強い溶血剤を使用しても、不注意な白血球溶解により、白血球計数の正確さには逆効果となる。

本発明の一態様によれば、たとえ以前はこれらの溶解しにくい赤血球のためにかなり困難であった、列挙した状況においても、完全溶血のために強い溶血剤を使用する。強い溶血条件による白血球集団に対する悪影響は、計算される白血球崩壊速度またはパターンの使用により補正する。これは、個々の白血球集団基準に関して外挿することにより、細胞分析サイクルの時

間0での白血球計数値が正確に推定される(図10)。

別の態様によれば、本発明方法を使用して、全血サンプルに存在するいわゆる増れやすいリンパ球の存在を検出する(正確に計数する)。リンパ球は、慢性リンパ性白血病、感染性単核球症および他の2、3の障害に苦しむ患者では、溶解に敏感であることが知られている。この溶解感受性は、赤血球の細胞溶解閾値を超えるのに必要な条件下でかなりの数のリンパ球が溶解することを含む。これは、このクロールな溶解感受性を完全に妨害するという無益な試みにおいて、細胞を歪めて固定し、安定化させるための苦心して作った高価なシステムを使用するときでさえ生じる。

この態様の実施においては、溶解耐性の赤血球を克服するための強い溶血剤はやはり使用するが、リンパ球数は経時的に密度にモニターする。リンパ球の計数は、溶血剤を添加した後、サンプルを検出部に流しながら、選択した時間間隔で行う。これらのリンパ球計数値は次いで、時間の関数として解析し、サンプル溶液に存在するリンパ球の数において測定可能な分解があるかどうかを調べる。次いで、崩壊速度の少なくとも1個の閾値を溶解感受性リンパ球の存在の指標として確立する。この

情報は、切り取って、サンプルを採取した患者の病状の診断の助けとするため使用することができる。そのようなスクリーニング情報は極めて価値があると考えられる。また、その情報は、疾病の治療の有効性をモニターするためにも使用することができる。既知疾病を新たに可能となるサブカテゴリーの間で区別するために使用することすらできる。

この態様では、所望により、異なる時間間隔から得たリンパ球計数情報を使用して、直線適合法(linear curve fitting techniques)によりリンパ球崩壊速度を得ることができる。これは、計数速度パターンを崩壊速度情報によって時間0に外挿することにより正確なリンパ球数の推定を可能にする。次いで、サンプル溶液に最初に存在する全リンパ球集団の正確な推定も可能である。

また、完全な溶血は、滅菌した海水および蒸留水を、ほぼ等張性の海水1体積に対して極めて低張性の蒸留水が4体積を超える割合で混合することにより得ることもできる。その結果得られる溶血性が強く非常に低張性の希釈剤は、低コストで世界的に利用可能であることから、白血球集団を確実に計数するのに有利である。しかし、この種類の溶血剤は、そのかわりに

白血球溶解性も有するので、今日まで全く受入れられなかった。この白血球溶解活性は、現在ではモニターすることができ、最終の白血球数の最終合計および小計において説明することができる。CELL-DYN[®] 3000シリーズの装置

本発明の好ましい態様では、Abbott CELL-DYN[®] 3000が、通常は循環しない別の細胞型の認識フラッグを出すことにより通常の5個の白血球サブ集団の区別を行う(NCCLS H20-A)。本明細書に開示した第5番目の時間的次元を追加する前は、CELL-DYN[®] 3000の白血球示数データが、染色されていない白血球の4次元光散乱特性のみに基づくものだった。これ以前の方法は、本出願人による同時特許中の米国特許出願第07/352,106号(1989年5月15日出願;発明の名称:流動血球測定の前解剤および5種類の白血球の示数計数を可能にする方法)に記載されている。この特許出願の開通部分は、参考として本明細書に組み入れる。

CELL-DYN 3000では、サンプル流量が150~350 μ lの全血の吸引(サンプリングモードに依存する)で始まる。吸引は、閉管または開管のサンプラーにより行われ、

では、このコアの直径が25~30 μ mである。通常は、この装置により、一定時間にレーザービームの感知領域に存在するのは単一の白血球のみである。従って、両所共在の問題は最小になる。もし、赤血球が効率的に溶解されていなかったならば、典型的には、妨害する100以上の赤血球がこの感知ゾーンに存在したであろう。さらに、流動チャンネル18は物理的口径が大きい(250 μ m²)ので、恐らく詰まることはない。それにもかかわらず、インピーダンス変換器で使用するもっと小さい口径の分解能を得ることができる。

図8は、CELL-DYN[®] 3000光学ベンチの図を示す。本出願人の米国特許第5,017,497号(「粒子の弁別器および方法」)の明細書を参考として本明細書に組み入れる。光源20は、偏光した5mWのヘリウム-ネオンレーザーであり、波長は632.8nmである。レーザーヘッドは、偏光面が垂直になる方向に向いている。レーザービームの向きおよび焦点は、前方表面鏡22、円柱レンズ24、別の前方表面鏡26、垂直レンズ28およびレンズ30により決定される。この方向決定により、サンプル流の中央コア32の領域におけるビームの強さは、必ず、「one over o

使用する装置の型に応じて手動または自動サンプル供給を使用する。吸引されたサンプルはせん断バルブに入り、正確な3個のアリコートが取り出される。32 μ lのアリコートの血液は溶血剤で250倍に希釈され、全白血球数(WBC)の測定および白血球の区別のために光学変換器に送られる。12 μ lのアリコートの血液はヘモグロビン試薬で250倍に希釈され、ヘモグロビン計として公知の分光光度計であるヘモグロビン変換器に送られる。0.8 μ lのアリコートの血液は、ほぼ正常系球状態(normotonic)の血液希釈剤で12,500倍に希釈され、血小板および赤血球のバルスデータの発生のためにインピーダンス変換器に送られる。

WBCおよび白血球分析

CELL-DYN[®] 3000は、光学変換器を使用して白血球の光散乱特性を測定するものである。変換器の流動セル10を図7に図示する。赤血球が名目上は溶解している血液の懸濁物が低速でサンプルノズル12から噴出される。ノズルでは、該懸濁物が、移動速度の速い流線の被覆膜14と接触する。流体力学焦点法(focusing)として知られる方法では、サンプル流が中央コア16まで細くなる。溶解シリカ流動セル

「squared」直径が約70 μ mのガウス分布になる。水平面では、エネルギープロファイルが、平らな上部の幅が約80 μ mである「シルクハット」状を示す。この配列により、サンプルコアが正常な位置からわずかに逸れたとしても、信頼できるデータが装置から得られるようになっている。

焦点に集まったレーザービームが溶解により生存する白血球に当たると、全ての方向に光が散乱する。光の波長は細胞の大きさに比べて小さいので、この散乱現象はMie理論およびMieマトリックスにより説明される。散乱光の一部は4個の光検出器により集められる。2個のシリコン光ダイオード34および36は、レーザービームの軸に関して約1~3度および約3~10度の半分の角度で散乱する光を測定する。これらの光ダイオード34および36は、各々「0度」および「10度」の検出器と言う。直接のレーザー光は遮断バー38によってブロックされる。これらの小さい角度での光散乱は、細胞の大きさに支配される複雑な作用であり、細胞構造または細胞の複雑さがいくらか寄与している。

レーザービームの軸に対して90度で散乱する光は、2個の光検出器(PMT)40および42を使用して集められる。光

ダイオードでない光検算器は、大きい角度で散乱する光が比較的少ないので、90度のチャンネルで使用される。衝突する偏光が単一表面から反射するだけであるならば、その最初の偏光垂直平面は保持される。しかし、例えば多くの順放または異方性構造によって、1個のセル内で何回も反射されると、散乱光は偏光角を変えることができる。この現象をCELL-DYN[®] 3000で利用するために、一方のPMT 42の前に水平偏光器41を設ける。この偏光器は、垂直に偏光された光が光検算器に当たるのを防ぐ。従って、「90度の偏光の偏りをなくす」PMT 42によって検出される光は、細胞構造（通常は白血球）との相互作用により「脱偏光」された光である。第二の光検算器40（「90度全（90 degree total）」PMTという）は、45度に置いたカバーガラス43に対して反射された散乱光を受け入れる。この直交する光の大部分は、まだ垂直に偏光されている。従って、このセンサー40は、直交方向に散乱した光全部の良好なモニターとなる。

直交散乱チャンネルは、対物レンズ44および散乱ストップ46により完全なものになる。角度の小さい散乱チャンネルは

穴のあいた鏡48も含む。

4個の光センサーから得られるデータを使用して、四次元の散乱図（図6）を作ることができる。これは、三次元の「固体」表現を空間で回転させることができるその装置のコンピュータグラフィックを使用して見ることができ、第4の次元は、その第4の次元で異なるパルスの大きさを表す要素に対する種々の色の選択により表現される。証拠として紙面にのこすために、四次元の散乱図は、二次元の散乱プロットまたは投影の対を使用者が6個選択して、また、一次元のヒストグラム投影を使用者が多数選択して確かめることができる。四次元の散乱図の2個の二次元表現を図6Aおよび図6Bに二重に示す。一次元ヒストグラムは、図4および5に示すフォーマットと類似する。

白血球の計数および白血球のサブ集団への分類（またはWBC）に使用される溶解剤は、白血球を急速かつ完全に溶解するように調製するのが最良である。CELL-DYN[®] 3000は、芳香族オキシエタノール、有機緩衝液（pHが8.5またはその付近であり、pH緩衝液を付与し、溶解剤の電導性を増加させる働きがある。）および非イオン性洗剤成分の水溶液から成る溶解剤を使用することができる。使用される

芳香族オキシエタノールは、好ましくは、2-フェノキシエタノールである。有機緩衝液は、トリス/HCl、ホウ酸、グリシル/グリシンおよびピシン（BICINE）から成る群から選択される。非イオン性洗剤は、Triton X-100、Triton X-114およびポリオキシエチレンまたはサッカライド誘導洗剤から成る群から選択される。本発明が導入される前の好ましい溶解剤は、本質的に20~80mMの濃度の2-フェノキシエタノール、トリス/HCl緩衝液およびTriton X-100で構成されていた。

本発明を利用するための特に好ましい態様では、溶解剤が、Triton X-100の水溶液、2-フェノキシエタノールおよびトリス/HCl緩衝液を含む。全血を過剰（典型的には50倍）この溶解剤と混合する。赤血球の飛躍的動的溶解は、浸透圧性の衝撃、非イオン性洗剤の作用および約8.5のpHの組み合わせにより強めて急速に起こる。溶解剤の最適組成物は以下の通りである。

2-フェノキシエタノール（25℃で液体） 750mM
トリス/HCl緩衝液、pH 8.5（500mMトリス）
1MのHClでpH 8.5に調整 1500mM

0.5%（v/v）Triton X-100水溶液
100mM

非イオン水 100lになる量

最適な組成物において、2-フェノキシエタノールは約41mMの濃度で存在するが、有用な濃度範囲は20~80mMである。トリス緩衝液のpHは、その性能に重要な影響がないならばpH 8.1まで下げることができる。その緩衝液のpHが9.0以上に大きくなると、試薬は溶血性がより大きくなり、より急速な飛躍的動的溶血が生じる。試薬量（約5% v/vまでのTriton X-100）または同様の非イオン性洗剤があると、典型的には溶解しにくいとみなされている抗体における溶血が完全なものになるが、この存在は、飛躍的動的溶血の促進もする。本発明以前は、これが、壊れやすい白血球を有する血液サンプルおよび溶解感受性細胞を有する血液サンプルにおけるリレンマであった。血液は4~6時間以上、in vitro保存するからである。

トリス/HClの代わりに他の有機緩衝液を使用してもよい。これらのうち、pHが8.5またはその付近のものは、ホウ酸、グリシルグリシンおよびピシン（Bicinchonine）があり、これ

らを溶解剤に使用してもよい。Triton X-114は溶解剤の非イオン性洗剤成分として使用できる。他の親水性洗剤は、ポリオキシエチレンまたはサッカライドヘッド基を有するものから選択することができる。

白血球の5種類の示差は、時間および光散乱に基づいてのみ求められる。細胞化学染色は必要ないので、CELL-DYN®3000、2は、費用効率的非常に高い、迅速なCBCをWBC示差とともに提供する。スループット(throughput)は、サンプルの処理法に応じて、1時間につき約100の血液サンプルである。各白血球の散乱特性によって得られるデータは、先に説明した4個の光検出器から得られる。

図9は、CELL-DYN®3000、1と連結したストリップチャートレコーダで記録した計数速度を示す。そのデータは、3つの異なる全血サンプルを示す。それらのサンプルの全赤血球は、サンプル分析サイクルの計数期の開始までに急速な溶解による崩壊が完了している。白血球サブ集団はどれも、不注意による重要な崩壊を示さない。なぜならば、サンプル分析サイクルの空にはまった典型的な計数期の間、溶解生存細胞数の経時的減少が実質的にないからである。この計数速度の安定

性を強調するために、図9のサンプル2および3に対するサンプル分析サイクルの間、分析器を強制的に再計数モードにした。この再計数値は、通常は、サンプルのWBC濃度が非常に低いときの自動発生に対して備えてある拡張計数モードである。15秒の日常的再計数時間の間、縦軸上で相対頻度として、また全血数として示される白血球数において明らかな崩壊はない。ストリップチャート計数速度で明らかな少数の異常は、ポアソン型の確率的ランダムさに基づいて予想される。

図10は、慢性リンパ性白血病であることがわかっている患者による対照的なストリップチャート結果を示す。図9および10に示すデータは、溶血性希釈剤(上述)を使用して得た。その希釈剤は、最も溶解耐性のある赤血球さえも充分に溶解することができるように選択した。図10は、各サンプル分析サイクル中の日常的計数および強制による再計数を示す。さらに、2個の該分析サイクルをそのサンプルに対して行う。再分析中の一致するパターンから明らかな白血球数の減少は、不均一または混合した白血球集団内に少なくとも一種類の溶解感受性を有するサブ集団が存在することを示す。壊れやすい均一なリンパ球集団は、溶解過程にある。図10の第二通路に加えた点線

は、白血球の崩壊パターンまたは白血球の計数速度のサンプル分析サイクル時間0への外挿を示す。2個の外挿により、最初の白血球数が302,000および301,000細胞/ μ l全血となった。これらの数字は、骨の折れる手動法により正しいことが確認された。

図6、9および10を利用すると、この全血サンプル中の壊れやすいリンパ球の存在を特に固定するために、本発明方法をどのように使用することができるかを示すことができる。

図9および10のモニタリングは、図6Aに見られる全データに対して行う。装置が正確に作動しているならば、この白血球領域での計数の減少が、サンプル中に溶解感受性を有する細胞が存在することを示す。というのは、この希釈剤の場合、メカニズムは知られていないが、モニターされる全領域の外側に存在する必要がある目に見えない細胞から細胞構造が出現することにより、この全領域の計数速度が増加できるようにこの四次元の全白血球領域が選択されているからである。言い換えると、特定の分析条件では、リンパ球の崩壊を、公知の細胞構造崩壊または粒子発生により遮断することができない。

次に、ソフトウェアのアルゴリズムにより、図6B1の二次

元図で領域Rとして投影されるサブ領域に四次元パルスを送ることによって、このサンプルの計数速度パターンを調べることができる。(図6のサンプルは、図10の特定のサンプルを表すものではない。図6Bの領域表示はかなり動的であり、詳細にはサンプルごとに異なることを理解しなければならない。)領域Rは、溶解しにくい赤血球が崩壊パルスパターンの理由となる場合、崩壊パルス速度が予想される領域である。(あるいは、動的に位置するL/R閾値は、本発明によれば、経時的に移動する。)領域Rはまた、ある無傷の白血球(例えば前骨髄性白血病由来のもの)が例外的に溶解し、彼の残りがこの領域に運ばれるとき、計数速度の増加が生じる領域でもある。その場合、図6Bの領域Rの上のモニターされる全領域に、少なくともこの大きさの計数減少が現れる。

そのような領域Rに特徴的な計数の増加が、相互領域Mの減少によって説明される場合は、「不安定な細胞領域で、前淋球性白血病と一致する。」という解釈を示唆することができる。図10の特定の場合は、領域Rにおける無視できるほど小さいが安定な計数速度の増加も減少もなかった。全白血球計数領域における減少全体は、リンパ球領域としての同様の質疑応答

(interrogation)により説明された。その結果、壊れやすい、または溶解感受性を有するリンパ球の集団が見出され、ウイルス性感染および白血病が考慮されなければならない。全血1μlにつき299,000という補正された非常に高いリンパ球数のために、装置のインタープリティブレポートは、「リンパ球集団は非常に壊れやすく、本発明の分析条件下(正常値:0)での標準化された崩壊速度は+++である。」とともに、数値による正しいアウトプットを補充することができる。報告された全血1μlにつきリンパ球299,000という計数は、このinvitro崩壊現象に対して補正されている。この血液情報は、慢性リンパ性白血病の診断と一致する。

CELL-DYN®3000, 2を使用する本発明のこの好ましい白血球の崩壊によれば、溶血により生存する細胞構造全体が、サンプル処理サイクルの計数中にモニターされる計数速度である。各々500ミリ秒の間隔に対して生き残る細胞数が、光散乱法によって得られる。

図11は、この方法でCELL-DYN®3000, 2により生じる崩壊速度データの型を示す。図11Aは、いわゆる溶解しにくい赤血球を有する4個の新生児血液サンプルに対して

得られた全白血球計数速度を表す。計数減少全体は、図6の領域RおよびLにおける崩壊によって説明された。今、この問題を切り取ると、CELL-DYN®3000, 3により、図9および10のサンプル分析サイクルの開始後45秒間待った後、計数期を開始することが可能である。これらの分析条件下では、新生児の赤血球は図6の領域Lをもはや侵食することなく、全白血球サブ集団は一般に、安定した計数速度を与え、そのような新鮮な血液サンプルに関する計数を補正する。

図11Bは、種々の治療段階にある慢性リンパ性白血病の5人の患者から採った血液サンプルに対して得られた崩壊パターンを示す。これらの患者の一人は、標準化したリンパ球の壊れやすさが++++であり、これは図10に見られるものに匹敵する。中央の二つは壊れやすさが++であり、残りの二つは壊れやすさが+である。その壊れやすさが統計的に無視できるものではないという事実は、図11Cと同様に説明される。その図において、縦軸の目盛りは、かなり高い解像度が示されるようにつけてある。図11Aおよび11Bでは、水平線の低い方から高い方まで、数が10倍増加している。図11Cでは、その増加がほんの1.5倍である。図11Cの2個のプロットを

より解像度の低い方眼上に表すと、それらは実際、図11BのCELLプロットの4個のように、ほとんど水平線になるであろう。

図11Cに示した患者は、図11Aの患者と同様、溶解しにくい赤血球を有する。しかし、前者は成人であり、そのメカニズムは、新生児の生理的に異なるヘモグロビンAとそれらの細胞の形状の相違との組み合わせというよりも、異常ヘモグロビン症である。図11Cの場合、崩壊は、図6B1の領域Rにおける崩壊速度によって完全に説明された。その結果、WBCは、CELL-DYN®3000, 1では、これらのサンプルに対して誤ってはいなかった。他方、CELL-DYN®3000, 2(および3000, 2A)に本発明を導入すると、これら二人の患者のヘモグロビンにおける先天的な異常を、全く予期せずによく導くことができた。血液学レポートのこの費用効果のある注釈は、臨床上、多くの場合に非常に有用である。それは、図2および5に関する部分で述べた実験的方法の溶血性白血球分析への組入れを表す。この新規で有効な赤血球の壊れやすさによる方法は、溶血性試験を適切に選択することによりさらに最適化を行うための重要な可能性を有

する。

CELL-DYN®3000, 1または2は、白血球を流動セルに一度通して処理する。CELL-DYN®3000Aという名称のCELL-DYN®3000の改良型も、本発明方法を利用することができる。CELL-DYN®3000Aは、白血球の処理に2個のチャンネルを使用する。CELL-DYN®3000の光学チャンネルとCELL-DYN®1300のインピーダンスチャンネルである。インピーダンスチャンネルは、粒子が小さい孔を通過するとき、その粒子によって作られる電気抵抗の変化を測定するよく知られている方法を使用する。同様の方法は、本出願人による米国特許第4,710,021号、第4,745,071号および第5,045,474号に記載されている。

CELL-DYN®3000Aにおいて、インピーダンスチャンネルは、溶解した全血を処理して、溫和であるが特定の方法で細胞質が「正常緊張状態によりむき出しに(isotripotically)」された無傷の細胞由来の白血球の核を計数することにより全白血球数を得る。こうして、光学チャンネルにより外排された白血球数を、インピ

ーダンスチャンネルにより完全に独立して異なるように最適化された白血球数によって確認することができる。正常緊張状態からわずかに高張性のインピーダンスチャンネルで計数した核は、進行性の白血球溶解に対して感受性がないので、確認が可能である。CELL-DYN® 3000、2Aでの二チャンネル法は、光学チャンネルからとインピーダンスチャンネルからの生の計数速度間に相関できる相違があるので、確れやすい白血球集団の存在をオペレータが確認することができる。

本発明のこの段階での利用で強調すべきことは、崩壊補正した光学WBC (WOCと称する) および散光な、必要であれば崩壊補正した核インピーダンスWBC (WICと称する) の間に重要な不一致がないことである。しかし、両方の方法によるデータの利用可能性は、ただ濾過し、部分的に希釈した標本を利用して全血分析を行うことができる極めて簡単な装置であっても、新しい有効な補正されたWOCの確立を促進する。CELL-DYN® 3000AのWOCおよびWICチャンネルにおいて溶血方法が頻々に調整できることも、新しく可能になった「相対的溶解感受性」崩壊速度パラメータの確立を可能にする。

この試薬の場合、赤血球がヘモグロビンを急速に放出し、ヘモグロビンはシアニドおよび第四アンモニウムと反応して安定な錯体を形成する。この錯体はヘモグロビン変換器を通過し、光路長1cmの流動セル中で540nmで吸光度を測定することにより測定される。この測定値は、試薬を含まないブランクに対する同様の測定に対して評価される。ヘモグロビン結果は、全血中での濃度により報告される。使用者は、g/dl、g/lまたはミリモル/lのいずれかの単位を選択することができる。

血小板および赤血球集団パラメータ

0.8μlの血液アリコートにヘモグロビン測定器の項で述べた希釈剤で12,500倍に希釈し、血小板および赤血球パルス発生用のインピーダンス変換器に移す。

インピーダンス感知ゾーンを通過する粒子により発生する各パルスを増幅し、内部参照電圧と比較する。それにより、血小板および赤血球を赤血球/血小板チャンネルに分ける。パルス数は細胞数の指標であり、パルスの振幅は、細胞容積に関連する。パルス振幅の周波数分布により、図4Aおよび4Bに示す容積ヒストグラムが得られる。

ヘモグロビン変換器

CELL-DYN® 3000および3000Aの装置は、ヘモグロビンを、第四アンモニウム塩と関連したヘム-シアニド錯体として測定する。

12μlの血液アリコートを溶血性ヘモグロビン試薬で250倍に希釈し、ヘモグロビン分光光度計に移す。ヘモグロビン試薬は、第四アンモニウム塩/KCN溶液と希釈剤との混合物である。希釈剤のpHは7.4±0.05であり、浸透圧は340±3mOsmである。その組成物は、NaCl, 7.9g/l; KCl, 0.4g/l; NaH₂PO₄, 0.2g/l; Na₂HPO₄, 1.9g/l; Na₂EDTA, 0.3g/l; NaF, 0.4g/l; 2-フェノキシエタノール, 3ml/lおよび1lとするための水である。ヘモグロビン分析の最良型では、第四アンモニウム塩溶液が異化テトラデシルトリメチルアンモニウム90g/lとシアニ化カリウム0.75g/lとを1lの脱イオン水に混合したものから成る。この第四アンモニウム塩溶液2lを10lの希釈剤と混合する。最後に、Triton X-114を0.25ml/lの濃度で添加する。

図4Aのヒストグラムを使用すると、次の血小板パラメータ：PLT (血小板数)、MPV (平均血小板容積)、PDW (「血小板分布幅」というより対数正規分布の幾何標準偏差を10倍したもの) およびPCT (血小板クリット) が血小板集団に対する種々の警報とともに誘導される。

図4Bのヒストグラムを使用すると、次の赤血球パラメータ：RBC (「赤血球数」)、MCV (平均血球容積)、RDW (「赤血球分布幅」というより分布の変動係数) およびHCT (ヘマトクリット) ならびに赤血球集団の種々のインタープリティブ分析が誘導される。さらに、下記パラメータ：MCH (平均の血球ヘモグロビン含量) およびMCHC (平均の血球ヘモグロビン濃度) ならびに種々のインタープリティブ分析がヘモグロビン値 (HGB) とともにコンピュータで計算される。

データを得る間に変換器を通過する希釈血液の容積は、完全な細胞数を導くために知っておかなければならない。血小板/赤血球チャンネルの場合、これは、米国特許第4,710,021号に記載の計量管を使用して行う。各サンプルの分析サイクルの細胞パルスおよび細胞数獲得期の間は、細胞がインピーダンスの孔を通過して引き出され、液体が計量管

を通過して引き出される。試薬のメニスカスが光学検出器を通過するとき、パルス獲得期がスタートして、血小板および赤血球の計数が同時に行われる。実際、図4Aおよび4Bの異なる2個の「試薬窓」のパルスは、2個の異なる電気回路で処理され、全てのデータは、いわゆるリストモードにデジタル値として記憶される。このパルス獲得は、メニスカスが第二光学検出器を通過するときに停止する。厳密に100 μ lまたは200 μ lの希釈血液が、検体に対して選択したモノメータに依存するこの間隔の間にインピーダンス変換器を通過する。計数時間を使用すると、オリフィスで破片を検出することができる。というのは、そのような物質は孔の有効な直径を小さくし、従って計数時間を増加させるからである。また、この破片は、サイジングデータに悪影響を及ぼす可能性がある。

(本発明は、図10および11に詳述した光学データだけでなく、図1〜5で示した血小板および赤血球のインピーダンスデータ全部に適用可能である。)

CELL-DYN[®]3000により、赤血球のサイズ分布から平均細胞容積(MCV)が導かれる。その結果は、前述したE.E.V. 11で直接報告される。ヘマトクリット結果は、全

血の単位体積当たりのパーセント充填赤血球または充填赤血球の比率(1/1)として報告される。

E.E.V. 11の目盛りは、電気的に得られるヘマトクリットが参照のミクロヘマトクリットまたは差心により得られる充填細胞容積(PCV)と必ず一致するようにすると、どの赤血球希釈剤およびインピーダンス分析器に対しても確立される。典型的な脱酸素化した新鮮なヒト血液サンプルの場合、そのような平均的な一致は、赤血球計数および電子MCVから計算されるヘマトクリット(HCT)がPCVと一致するように換算してある赤血球パルスを目盛ることにより達成される。

$$HCT = (RBC \text{ 数} \times MCV) / 10 = PCV$$

赤血球分布幅(RDW)は、赤血球の容積分布から求められる。それは、簡単に、任意深く抽出したヒストグラムピークのC.V. (%)である(C.V. = (SD/平均) × 100)。このパラメータは、赤血球の同質性溶解(isocytosis)およびキロ細胞溶解(kilocytosis)の指標である。RDWは、血液のよごれ(blood smear)で見られる不均赤血球溶解(anisocytosis) (赤血球のサイズの変化)の程度および変形赤

血球溶解(poikilocytosis) (赤血球の形の変化)の程度の両方により変わる。上記パラメータは全て臨床的に有用な結果である。

これらの結果は、各サンプル処理または測定サイクルの完了時にモニター上に表示される。使用者は、このディスプレイおよび印刷物に預ける結果の順序および様式に対して自由に調節できる。溶解により生存する白血球から得られる四次元光散乱データからの抜粋は、二次元散乱図として(図8に示すように)、および/または選択可能なヒストグラムとして(本明細書では図示しないが、図4に示すものと同様)、表示することができる。絶対的な白血球数は、千個/ μ l全血の単位またはS1単位などの他の単位で表示することができる。赤血球データは、E.E.V. 11で区分した換算を有する容積頻度分布ヒストグラムとして表示される(図4Bに例示)。絶対的な赤血球数は、100万個/ μ l全血の単位またはS1単位などの他の単位で表示される。血小板データは、E.E.V. 11で区分した換算を有する容積頻度分布ヒストグラムとして表示される(図4Aに例示)。絶対的な血小板数は、千個/ μ l全血の単位またはS1単位などの他の単位で報告される。

コントロールおよびデータ処理特性

CELL-DYN[®]3000の操作は、系の状態をモニターし、データを記憶し、QCプログラムを実行し、異常データに対してフラグを出し、診断上のチェックを行う3個のマイクロプロセッサにより制御される。データ処理のコンピュータを使用して細胞増殖速度が計算され、これは、細胞集団の全生存特性の質疑応答に使用される。不注意による白血球溶解に対して白血球集団数を補正するために必要な白血球増殖速度は、該速度1個のみである。

CELL-DYN[®]3000は、各測定サイクル後に、使用者が選択可能な多数組の数値的・グラフ的データを自動的に表示する。換体の測定は、実行モードの選択により行われる。換体は、次のように同定することができる。患者、低コントロール、正常コントロール、高コントロール、戻り、選択したサンプルの型など。オペレータの識別、日付、時刻などは、キーボードによって入力できる。表示されたデータは、グラフィックプリンターによってZに折り畳んだ用紙(8.5" × 11")に印刷することができる(その画面に対して単一のレポート)。あるいは、マルチコピーチェックレポートも同じプリンターで

印刷できる。

コンピュータのハードディスクに対して選択したサイズに応じて、電流2,000~10,000サイクルに対するデジタル合計データは、自動的に記憶される。このデータは、要求に応じて呼び出したり、印刷することができる。各データファイルはグラフィックデータを含み、下記情報を含むことができる。レーケンス番号、検体の型、検体の識別番号（使用する場合）、日付、時刻、オペレータの識別およびオペレータが上記したものから選択した全パラメータに対する数値的グラフィックデータ。さらに、数値的データは、装置のモニターパラメータ、および本発明のパラメータをモニターする細胞集団繁殖速度を含むことができる。

使用者は、準備モードにより数値的データの範囲をセットすることができる。これらの範囲外のデータは、使用者が選択可能な目立つ色調でビデオスクリーン上に表示され、レポートには肉太体で印刷される。赤血球および血小板に対して動的にモニターされたデータまたは溶解により生存する有核白血球に対する四次元の散乱図のデータがある基準を満たさない場合、影響をうける各領域は、完全に印字された警告メッセージにより

フラグが出される。

本発明を説明するために、代表的な態様および詳細を示したが、請求の範囲で規定する本発明の範囲から逸脱しない限り、種々の変形および修正を行うことができる。

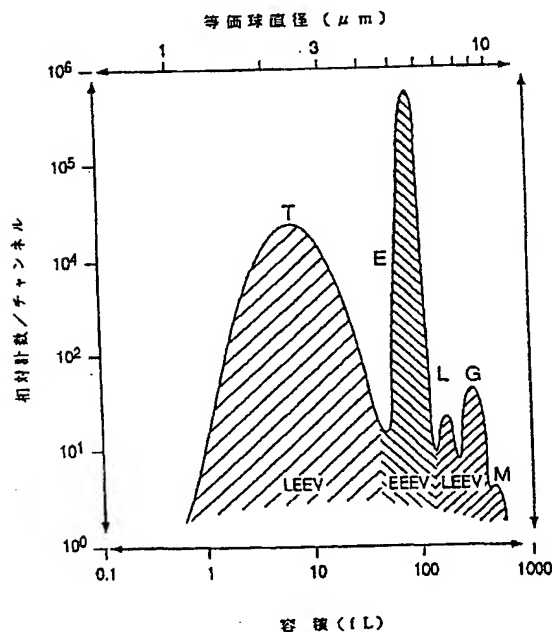


図 1

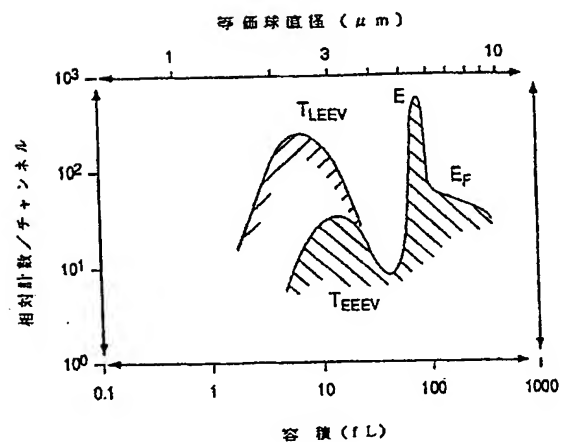


図 2

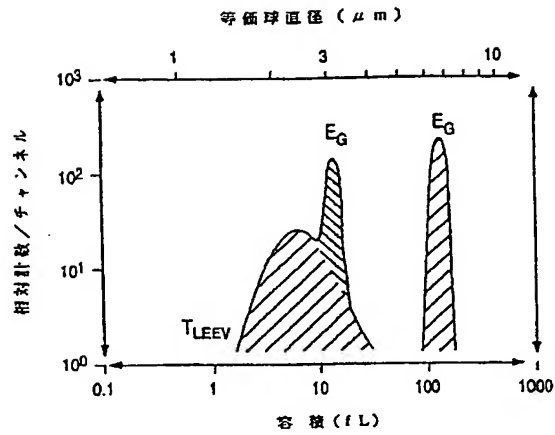


図 3

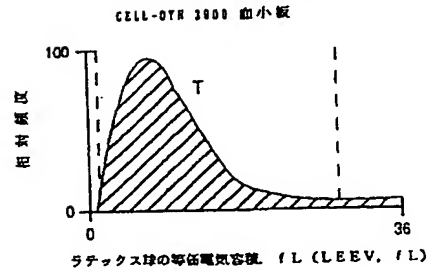


図 4 A

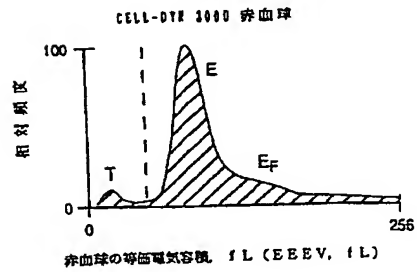


図 4 B

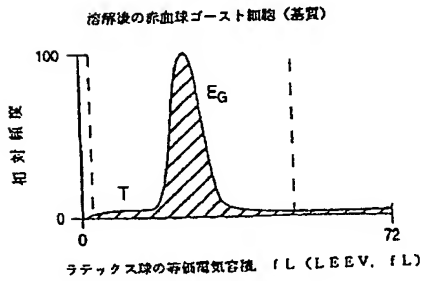


図 5 A

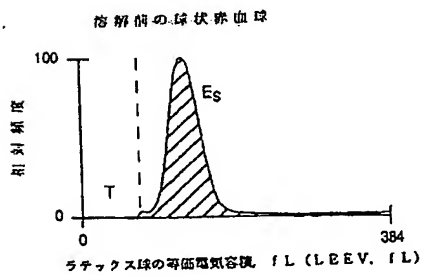
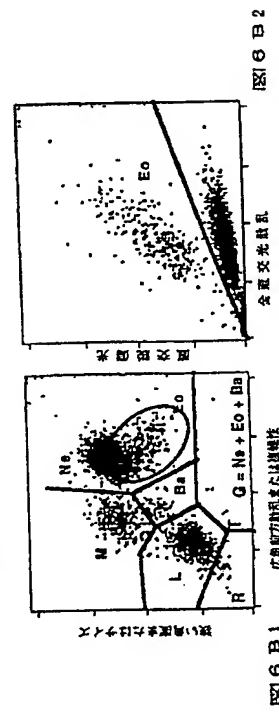
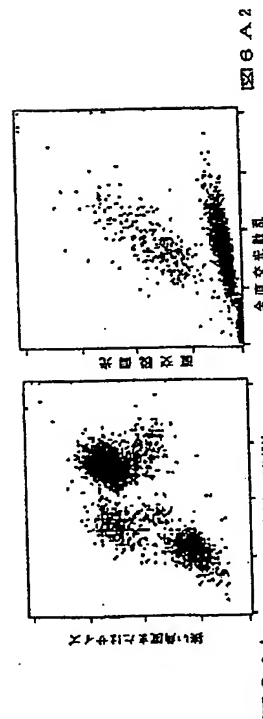


図 5 B



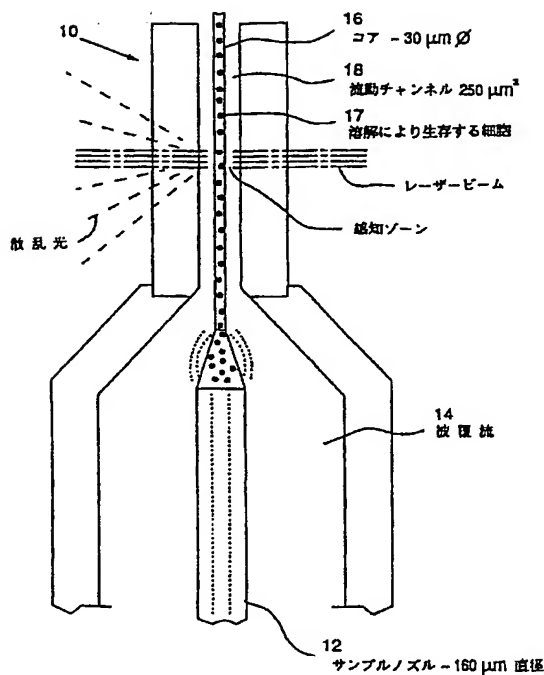


図 7

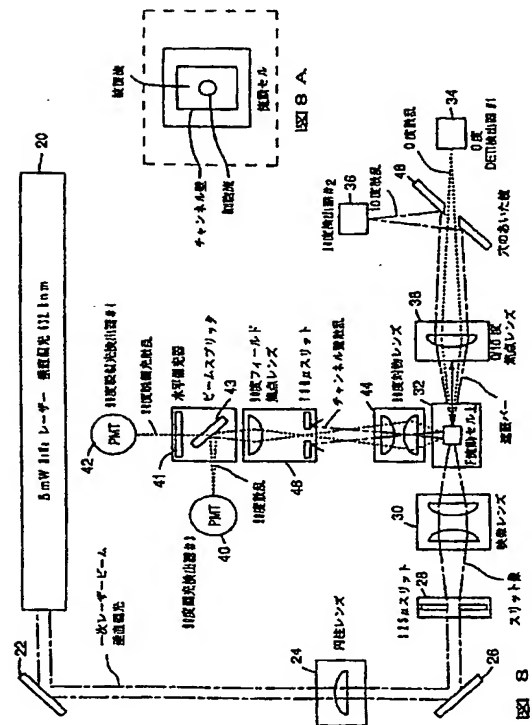


図 8

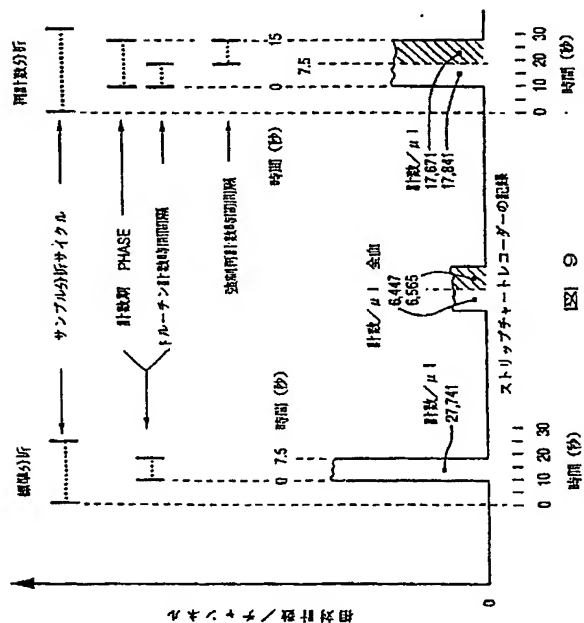


図 9

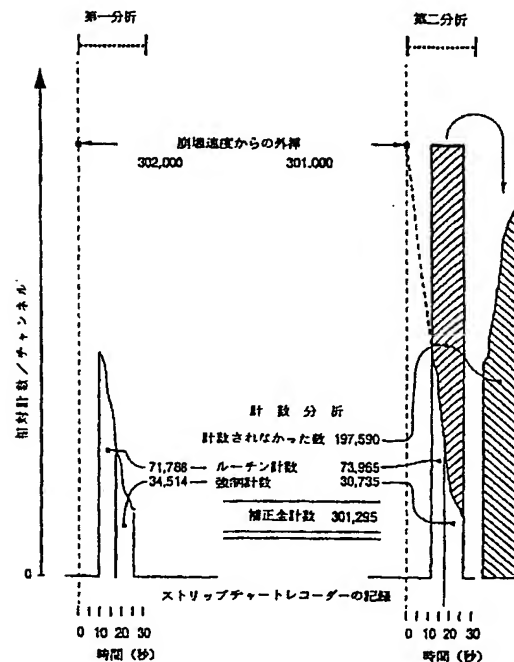
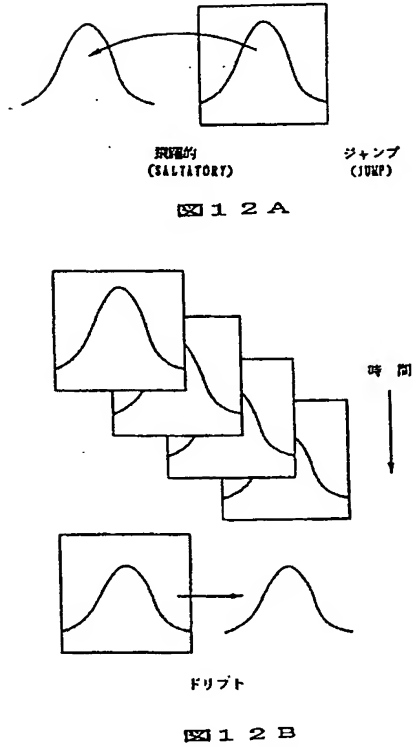
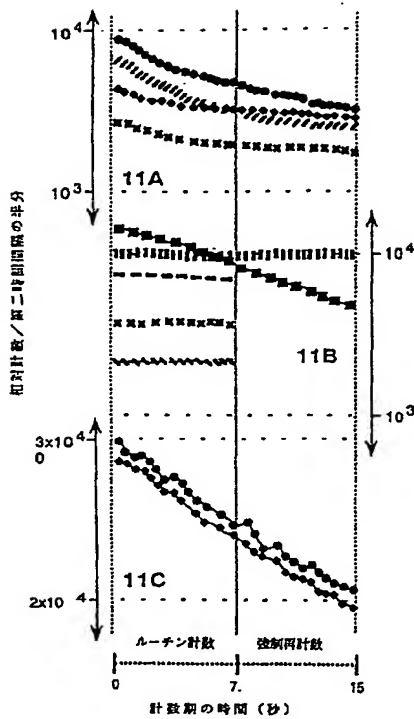


図 10



国際調査報告		International application No. PCT/JP93/00917
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC Class. (CPC) 2348 US CL. 45403 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 45403, 10, 17, 18, 34, 130, 164; 35479; 4317.21, 7.34, 7.25, 2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base searched during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
Y	US, A, 4,637,986 (Brown et al) 20 January 1987, entire document.	1-79
Y	US, A, 4,882,284 (Kirchanski et al) 21 November 1989, col. 3, lines 7-20.	31-79
A	US, A, 4,902,613 (Chang et al) 20 February 1990, entire document.	1-79
A	US, A, 4,731,179 (Ledis et al) 14 June 1988, entire document.	1-79
A	US, A, 4,425,427 (Linderer) 10 June 1984, entire document.	1-79
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family across.		
* Special categories of cited documents: "a" documents published after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "b" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "c" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "d" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "e" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "f" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "g" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "h" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "i" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "j" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "k" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "l" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "m" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "n" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "o" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "p" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "q" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "r" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "s" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "t" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "u" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "v" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "w" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "x" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "y" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention; "z" documents published on or after the international filing date of the invention but before the date of publication of the invention;		
Date of the latest completion of the international search 16 APRIL 1993		Date of mailing of the international search report 21 APR 1993
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Room 2C1 Washington, D.C. 20531 Foreigner's Mail, POST OFFICE BOX 1000 Patent PCT/ISA/210 issued about 10/1/93		Authorized officer LIEN TRAN Telephone No. (703) 791-5121

フロントページの続き

(72)発明者 グレイジャー, ジョン
アメリカ合衆国、フロリダ、ペンブロウ
ク・バインズ、サウス・ウエスト・ワンハ
ンドレッドアンドサートイーンズ・アベニ
ュー・511

(72)発明者 ロシエ, ジョン・ダブリュ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・95037、
モーガン・ヒル、パイア・コーフィノ・
15170

(72)発明者 デイレクター, ブルース・エイ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・95951、
サンタ・クララ、キーリー・ブールバー
ド・938・シー